

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA
ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO

TESIS

Polimorfismo de la región C-terminal de la proteína de superficie del merozoíto-1 de *Plasmodium vivax* colectados en Nicaragua

Requisito parcial para optar al grado de:
Maestro en Ciencias de la Salud con Área de Concentración en
Enfermedades Transmitidas por Vector

Presenta:

Q.F.B. Sleidher Gutiérrez López

Director de Tesis:

Dr. René Cerritos Flores

Asesores:

Dra. Lilia González Cerón

Dra. Teresa López Ordóñez

Tapachula, Chiapas

Agosto de 2014

Este trabajo se realizó en el laboratorio de inmunoparasitología molecular del Centro Regional de Investigación en Salud Pública, con recursos financieros del proyecto CONACyT- México: CB-2009-01-131247 “Estudio molecular de los parásitos de *Plasmodium vivax* que persisten en México y Nicaragua” bajo responsabilidad de la Dra. Lilia González Cerón

Polimorfismo de la región C-terminal de la Proteína de Superficie del
Merozoíto-1 de *Plasmodium vivax* colectados en Nicaragua.

Artículo sometido de acuerdo a los requerimientos del Instituto Nacional de Salud
Pública para obtener el grado de Maestro en Ciencias de la Salud con Área de
Concentración en Enfermedades Transmitidas por vector

Por:

Q.F.B. Sleidher Gutiérrez López

Agosto, 2014

Dedicado:

A ustedes que me enseñaron los principios que rigen mi vida, mis padres, María Icela y José Guadalupe.

En especial a ti mamá, que nunca has dejado de apoyarme, te amo.

A ustedes que son la alegría de mi vida, mis hermanos, Mauricio, Yeni y Mario.

A ti que caminas junto a mí en la vida como amiga y esposa, Ana Laura.

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. René Cerritos Flores por su dirección y supervisión durante la realización de la tesis, principalmente en el análisis de los datos, su presentación e interpretación. Por todas sus horas de dedicación y sus conocimientos compartidos procurando mi formación profesional.

A la Dra. Lilia González Cerón, que confió en mí para la realización de esta tesis. Por guiarme durante este laborioso período y por todo el apoyo brindado. Sus conocimientos y experiencia académicos, así como sus consejos fueron parte importantísima para que culminara esta tesis.

Al Dr. Alberto Montoya y todo el personal que labora en los laboratorios centinela en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR) del Ministerio de Salud de Nicaragua (MINSa).

Al personal del laboratorio de Inmunoparasitología molecular, a la QFB. Frida Santillán Valenzuela quién fue guía y apoyo fundamental en el trabajo de laboratorio. Al QFB. Marco Alessio Sandoval Bautista quién trabajo codo a codo junto a mí y siempre con el mejor de los ánimos. Al QFB. Rafael Avendaño y QFB. Olga L. Palomeque quienes siempre estuvieron apoyándome durante mi estancia en el laboratorio. Gracias por el apoyo técnico y por compartir sus experiencias y amistad.

A mis profesores de maestría, todos me brindaron un poco de su saber y experiencia.

A mis compañeros del posgrado y más que amigos, hermanos: Delfino de Jesús Gómez Pérez, Oscar Carmona Castro y Luis Alberto Cisneros, por todos los momentos en que pensamos juntos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el invaluable apoyo económico brindado durante la maestría y en la realización de esta tesis.

Al Instituto Nacional de Salud Pública por las facilidades proporcionadas durante los dos años que duró el posgrado hasta la culminación de esta tesis.

CONTENIDO

RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	9
MÉTODOS	12
Obtención de las muestras	12
Extracción de ADN de papel filtro y amplificación del fragmento <i>mspI</i>₄₂	12
Purificación y secuenciación	13
Revisión y análisis de datos	13
Diversidad genética	14
Selección Natural	14
Diferenciación genética	14
Relaciones genealógicas (red de haplotipos)	15
RESULTADOS	16
Polimorfismo genético en <i>mspI</i>₄₂ de <i>P. vivax</i> de Nicaragua	16
Diversidad genética.	17
Selección Natural y Recombinación.	19
Diferenciación genética (F_{ST})	20
Red de haplotipos.	21
DISCUSIÓN	23
BIBLIOGRAFÍA	27
ANEXO 1.	30

RESUMEN

Plasmodium vivax, es un parásito de amplia distribución y prevalencia en regiones de Asia, Medio Oriente, Sudamérica y Centroamérica; biológicamente se caracteriza por ser genéticamente muy diverso comparado con otros parásitos protozoarios. En algunos de sus genes, sobre todo los relacionados con la invasión del reticulocito, gran parte de las mutaciones se ven favorecidas por selección diversificadora y posteriormente, las altas tasas de recombinación aumentan y uniformizan la poza génica. A pesar de que ya se conoce la estructura genética de este parásito en varios países, siempre, cuando se describen nuevos aislados de un país o una nueva región, aparecen genotipos con nuevos polimorfismos. En el presente trabajo analizamos la estructura genética de *P. vivax* en Nicaragua, un país en fase de control de paludismo, usando el fragmento de 42kD de la proteína de superficie del merozoíto – 1 (*mspI₄₂*).

Se obtuvo la sangre infectada de las personas que viven en los distintos municipios de Nicaragua. El fragmento *mspI₄₂* se amplificó y se obtuvo la secuencia nucleotídica. El análisis consistió en la determinación de la diversidad genética, el grado de diferenciación por *F_{ST}* el coeficiente de selección dN/dS y las relaciones genealógicas por red de haplotipos. Se incorporaron las secuencias de *mspI₄₂* reportadas para otros sitios geográficos.

Los resultados de 89 secuencias revelaron ocho haplotipos de los cuales seis no se han reportado previamente y uno de ellos se presenta solo en la región de Chinandega, en el pacífico. La diversidad medida por *Pi* (π) y *tetha* (θ) es similar a otros países y el grado de diferenciación no parece mostrar una relación entre la genealogía con la distancia geográfica. Aunque el coeficiente de selección es similar a lo encontrado en otros estudios, donde el subfragmento *mspI₃₃* es altamente diverso y está sujeto a selección positiva, en Nicaragua hay nuevas sustituciones, unas sujetas a selección negativa y otras a selección positiva. La reconstrucción genealógica sugiere que de los ocho haplotipos encontrados solo tres están cercanamente relacionados y al parecer se diversificaron en este país, los cinco haplotipos restantes probablemente llegaron en eventos independientes de otras regiones del mundo. Los resultados muestran que el polimorfismo de *P. vivax*, en un país aún en fase de control, concuerda con lo que puede predecirse desde el punto de vista genético: los parásitos son muy diversos a causa de selección

positiva, altas tasas de recombinación y a los frecuentes eventos de inmigración de portadores de nuevos haplotipos originados en otras regiones del mundo.

Palabras clave: *Plasmodium vivax*, Polimorfismo, Diversidad Genética, Selección Natural, Diferenciación genética, Red de haplotipos, Nicaragua.

INTRODUCCIÓN

Plasmodium vivax, es una de las cuatro especies de parásitos protozoarios causantes de paludismo y el de mayor prevalencia y distribución a nivel global. Su distribución es amplia en Asia, Medio Oriente, América Central y del Sur (Mendis et al. 2001; Guerra et al. 2010). La Organización Panamericana de la Salud (OPS) reportó en el 2012, para las américas, 469,380 casos de paludismo, de los cuales, 75% fueron causados por *P. vivax*. La mayoría de los países en América Central se encuentran aún en fase de control y unos cuantos en fase de pre-eliminación. En Nicaragua a pesar de que del año 2000 (22,645 casos) al 2011 (775 casos) se logró un descenso de más del 90% en el número de casos de paludismo por *P. vivax*, aún se encuentra en una fase de control. Honduras, país vecino, también se encuentra en etapa de control y su disminución de casos en el mismo período fue del 79% (de 33,679 a 7010 casos), sin embargo el número de casos es mucho mayor al compararlo con Nicaragua. El caso de México y Costa Rica, países en estado de pre-eliminación, es un poco diferente ya que presentan un número de casos mucho menor en el mismo período. México disminuyó sus casos en un 85% (de 7,259 a 1,124 casos) y Costa Rica un 99% (de 1867 a 13 casos) (PAHO 2012). Estudios previos en esta región señalan que la mayoría de los parásitos circulantes son genéticamente únicos comparado con otras regiones, además de tener una estructura genética particular (Lopez et al. 2012; Corzo 2013; Cerritos et al. 2014). Cerritos et al demostraron la existencia de al menos tres linajes de haplotipos en el sur de México, los cuales han tenido varios eventos de hibridación y una subsecuente diversificación (Cerritos et al. 2014). Múltiples trabajos han evidenciado que esta dinámica evolutiva, sobre todo en países endémicos o hipo-endémicos, puede aumentar la diversidad a causa de la existencia de múltiples clonas en un mismo vector, lugar donde ocurre la fase sexual del parásito y por consiguiente eventos continuos de recombinación (Arnott et al. 2012). Las nuevas variantes genéticas pueden mantenerse o eliminarse dependiendo de las presiones selectivas tanto del mosquito vector como del hospedero humano (Putaporntip et al. 2002).

Uno de los genes de *P. vivax* que está fuertemente seleccionado es el que codifica para la proteína de superficie del merozoíto-1 (*mSP1*), la cual juega un papel importante en la invasión al reticulocito sanguíneo del hospedero (Babon et al. 2007; Ahlborg et al. 2002; Han et al. 2011; Thakur et al 2008). Esta proteína participa en el primer contacto entre el merozoíto y el reticulocito (Alexandre et al. 2010; Cui et al. 2003; Cheng et al.

2013; Fleck et al. 2003; Putaporntip et al. 2002). Primero se sintetiza como un precursor de alto peso molecular (200 kDa) en la esquizogonia y es procesada por vía proteolítica en cuatro polipéptidos de aproximadamente 83, 30, 38 y 42 kDa (Putaporntip et al. 2002; Kang et al. 2012; Maestre et al. 2004; Miahipour et al. 2012). Posteriormente, durante el proceso de invasión, la región C-terminal de 42 kDa se procesa en dos fragmentos de 33 kDa (MSP1₃₃) y 19 kDa (MSP1₁₉). Este último fragmento permanece en el merozoíto durante la invasión al reticulocito pero los demás fragmentos son liberados de la superficie (Holder et al. 1992; Kang et al. 2012). Los análisis de diversidad genética del fragmento C-terminal han reportado que la secuencia del subfragmento *mSP1₃₃*, es altamente variable, mientras que la secuencia de *mSP1₁₉* es muy conservada debido a ello, este último, induce la producción de anticuerpos bloqueadores de la invasión (Zakeri et al. 2006; Thakur et al. 2008; Putaporntip et al. 2002; Kang et al. 2012). El subfragmento *mSP1₃₃* además de ser altamente polimórfico a causa de mutación por sustitución y frecuentes eventos de recombinación, tiene alta intensidad de selección positiva, en cambio, en *mSP1₁₉* los pocos polimorfismos que ahí ocurren están sujetos a presión selectiva de tipo negativa (Putaporntip et al. 2002; Kang et al. 2012; Ahlborg et al. 2002; Alexandre et al. 2010; Babon et al. 2007).

La transmisión activa de *P. vivax* dentro en las áreas endémicas implica que múltiples genotipos del parásito pueden a menudo co-infectar el mismo hospedero. Además, la alta prevalencia del parásito, con la compleja dinámica de migración y dispersión tanto del hospedero como del vector hace que una región potencialmente genere nuevas variantes del parásito que a su vez se dispersen a nuevos sitios. Esta dinámica parece ocurrir en la mayoría de los países en fase de control, por ejemplo Nicaragua. Además de completar la lista de genotipos existentes en cada una de las regiones, es importante determinar cómo se originan, se mantienen y se dispersan los nuevos genotipos en el mundo. Los análisis de frecuencia y distribución pueden también ayudar a proponer nuevas medidas de control. En el caso particular del gen *mSP1*, pueden aportar información relevante para diseñar y evaluar nuevas vacunas (Arnott et al. 2012; Thakur et al. 2008).

En el presente estudio analizamos la estructura genética de los parásitos de Nicaragua basados en la región C-terminal del gen *mSP1*. Para evidenciar nuevos polimorfismos y el tipo de selección a la que están sujetos, se determinó la diversidad genética y la tasa de selección por ventanas de cada fragmento *mSP1₃₃* y *mSP1₁₉*. Se

obtuvieron secuencias del mismo fragmento *msp1* del GenBank de otros sitios geográficos para determinar el grado de diferenciación genética bajo el supuesto de que los países cercanos comparten una poza génica. Finalmente, con la finalidad de definir el origen geográfico y las relaciones de parentesco de los individuos aislados en Nicaragua, se construyó una genealogía mediante una red de haplotipos.

MÉTODOS

Obtención de las muestras

Las muestras se obtuvieron de pacientes sintomáticos que fueron atendidos en los laboratorios centinela del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR) del Ministerio de Salud de Nicaragua (MINSa) de dos regiones geográficas: la zona de la Región Autónoma del Atlántico Norte (RAAN) situada en colindancia con el Océano Atlántico; en los municipios de Waspam (50 msnm, 14° 43.994´ N, 83° 56.458´ O), Rosita (66 msnm, 13° 52.004´ N, 84° 23.467´ O), Puerto Cabezas (16msnm, 14° 1.828´ N, 83° 23.089´ O), Bonanza (220 msnm, 14° 1.800´ N, 84° 35.715´ O), Siuna (200 msnm, 13° 44.114´ N, 84° 46.653´ O) y Alamikamba (22 msnm, 13° 30.589´ N, 84° 13.200´ O) y de la región de Chinandega situada en colindancia con el Océano Pacífico; en los municipios de Chinandega (65 msnm, 12° 37.474´ N, 87° 7.802´ O) y El Viejo (50 msnm, 12° 39.769´ N, 87° 9.958´ O). La obtención de muestras se realizó durante el período 2012-2013. El diagnóstico de paludismo se hizo mediante el análisis microscópico de gota gruesa en los laboratorios de los centros de salud. A los pacientes que resultaron positivos a la infección con *P. vivax* por microscopía se les solicitó su consentimiento informado para la toma de unas gotas de sangre capilar, las cuales fueron impregnadas en papel filtro Whatman # 2. Las muestras se secaron y preservaron en silica gel en la oscuridad y fueron transportadas al laboratorio de Inmunoparasitología molecular del Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP).

Extracción de ADN de papel filtro y amplificación del fragmento *msp1*₄₂

La extracción de ADN se realizó utilizando un kit comercial Qiagen Qiamp blood Minikit (Qiagen CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto eluido con el ADN se guardó a -20°C hasta su uso.

La amplificación de los fragmentos se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se diseñaron los siguientes iniciadores *msp1*-F (5´-GCC GAG GAC TAC GAC AAA G-3´) *msp1*-R (5´-CCT CCA GCT TCC TAA GCT TG-3´) empleando secuencias descargadas del Gen Bank, las cuales se alinearon con el algoritmo Clustal W (Thompson et al. 1994) para ubicar las regiones conservadas y elegir las que incluyeran el fragmento a amplificar. Se estandarizó la reacción según las condiciones que a continuación se describen. La mezcla de reacción se preparó a un volumen final de 50µl

con 4µl de ADN, 2.6µl de la mezcla de oligonucleótidos (1.25mM), 2.6µl de cada iniciador (10pM), 1.3µl de MgSO₄ (50mM), 5.0µl de buffer 10X, 0.2µl de Taq Platinum DNA polimerasa (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA. High-fidelity) y 31.6µl de agua grado biología molecular. Para realizar la amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 95°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 75 segundos, con un ciclo de extensión final de 72°C por 10 minutos en un termociclador MyCycler (BioRad Hercules CA, USA). El fragmento C-terminal amplificado comprende 982 pb (1384-1710: coordenadas de los aminoácidos tomando de referencia la secuencia de la cepa salvador-I, número de acceso XM_001614792).

El fragmento amplificado se examinó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio (100V por 60 minutos) y se documentó con un transiluminador de luz ultravioleta (UV) con equipo de foto-documentación™ digital (UVP Inc., Upland, California).

Purificación y secuenciación

Los productos de PCR de aquellas muestras en las que se obtuvo cantidad suficiente, se purificaron con el kit comercial MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN purificado se cuantificó con el equipo NanoDrop ND2000 (Thermo Scientific, USA). Las muestras con una concentración de al menos 30 ng/µl se secuenciaron en ambos sentidos con los mismos iniciadores del PCR por el método de Sanger en la Unidad High Throughput Genomics, Department of Genome Sciences, Universidad de Washington, Seattle, USA.

Revisión y análisis de datos

La calidad de las secuencias obtenidas de cada aislado en ambos sentidos, se revisó manualmente y se obtuvo la secuencia consenso. Se identificaron los polimorfismos de *P. vivax* de Nicaragua a nivel de nucleótido y aminoácido, y se determinaron los haplotipos. Para elaborar la tabla 1 de polimorfismos de *mssl42*, se utilizaron como referencia las secuencias de las cepas Salvador I (XM_001614792) y Belem (AF435594). El código del haplotipo se asignó de acuerdo a su frecuencia (desde N1 el más abundante, a N6, N7 y N8 los de menor frecuencia).

Para el análisis de genética de poblaciones se incluyeron secuencias de *mssl42* diferentes zonas geográficas depositadas en el Genbank: Bangladesh (n=5: AF435616-AF435620), Brasil (n=8: AF435622-AF435625, AF435627, AF435629-AF435631),

Corea del Sur (n=23: AF435635-AF435638, JQ446312-JQ446322, HQ171934-HQ171941) India (n=29: EU430452-EU430479, AF435639), Singapur (n=49: GU971656-GU971705), Sri Lanka (n=95: GU175174-GU175268), Tailandia (n=80, AF435593-AF435599, AF435601-AF435615, GQ890917-GQ890974), Turquía (n=30: AB564559- AB564588), Camboya (n=27: JX461286- JX461290, JX461292, JX461293, JX461295, JX461297, JX461298, JX461300-JX461306, JX461308, JX461309, JX461314, JX461315, JX461317, JX461321, JX461324, JX461326, JX461331, JX461333), Myanmar (n=28, JX490129-JX490156), China (n=2: JX993754-JX993755) y secuencias del Sur de México (n=34, no reportadas). En total 89 secuencias de Nicaragua, el Sur de México y del GenBank se alinearon utilizando el algoritmo de alineamiento múltiple de secuencias Clustal W (Thompson et al. 1994).

Diversidad genética. Se calcularon los índices de diversidad genética: π – ($\pi = 2 \sum_{i < j} dij / (n(n - 1))$) que es el promedio con corrección de Jukes-Cantor de sustituciones de nucleótidos por sitio entre dos secuencias (Nei y Li, 1979); y $\theta = K/a$, donde **K** es el número de sitios segregativos en una muestra de secuencias y $a=1+1/2+\dots+1/n-1$, donde **n** es el número de secuencias en la muestra (Watterson, 1975), por país y por ventanas traslapadas cada 100 nucleótidos y con traslape de 50, bajo el supuesto de variación en las tasas de diversidad en el fragmento. Además se calculó el número de sitios de polimórficos (S) y número de haplotipos (H) utilizando el software DnaSP v5.10.01 (Librado & Rozas 2010).

Selección Natural. Para estimar la selección a nivel molecular se calculó el número de mutaciones sinónimas (*s*) y no sinónimas (*ns*). Se compararon las tasas de sustituciones sinónimas versus no sinónimas (*dS-dN*) que se presentaron en el fragmento *msp142* por país y a nivel global. Se utilizó el método de Nei-Gojobori con corrección de Jukes-Cantor con un error estándar determinado por replicas con 1000 bootstrap utilizando el software MEGA 5.0. (Tamura et al. 2011).

Diferenciación genética. El índice de diferenciación genética (F_{ST}) para el fragmento *msp142* se realizó a partir de comparaciones pareadas entre los sitios polimórficos de las secuencias de los distintos municipios de Nicaragua y por países. El ajuste del cálculo de los valores F_{ST} se realizó mediante el modelo de Kimura 2 parámetros con el software DnaSP v5.10.01 (Librado & Rozas 2010).

Relaciones genealógicas (red de haplotipos). Con la finalidad de reconstruir la historia evolutiva y las relaciones genealógicas entre los haplotipos de Nicaragua con parásitos de otras regiones del mundo, se construyó una red de haplotipos (usando el programa TCS 1.21 (Clement et al. 2000) el cual emplea predicciones derivadas de la teoría de coalescencia. En la red, la conexión entre haplotipos analizados representa un paso mutacional entre las secuencias. La conexión entre haplotipos muestreados puede extenderse a más de dos estados mutacionales que podrían ser haplotipos no muestreados o ya extintos, los cuales se representan en cuadros pequeños. El color de los círculos representa el país al que corresponden los haplotipos mientras que el tamaño del círculo representa la frecuencia de los haplotipos. Para enraizar la red de haplotipos se incluyó la secuencia de *Plasmodium cynomolgi* (número de acceso DQ907679).

RESULTADOS

De un total de 323 muestras de ADN de sangre infectadas con *P. vivax*, provenientes de Nicaragua, 296 del RAAN y 27 de Chinandega, en un único intento de amplificación 114 no amplificaron y de 97 no se obtuvo suficiente producto de PCR, de 11 sólo se obtuvo un solo sentido al secuenciar y de 12 se obtuvieron las dos hebras pero presentaron inconsistencias al realizar el consenso. De 89 aislados se obtuvo la secuencia consenso, 82 muestras fueron de pacientes del RAAN y se distribuyeron en los municipios como sigue: Rosita (n=32), Bonanza (n=19), Waspam (n=16), Siuna (n=12), Puerto Cabezas (n=3) y Alamikamba (n=1). Siete muestras fueron de Chinandega, región próxima al Océano Pacífico, de estas dos fueron del municipio de Chinandega y cinco del municipio del Viejo.

Polimorfismo genético en *msp142* de *P. vivax* de Nicaragua

Todos los polimorfismos fueron por cambio en el nucleótido y se detectaron en el fragmento *msp133* comprendido entre los nucleótidos 4150 y 4875, mientras que en el subfragmento *msp119* (4876- 5131) no se encontró ningún cambio.

Tabla 1. Polimorfismo de nucleótidos y amino ácidos del fragmento MSP142 de *P. vivax* de Nicaragua durante 2012-2013. Los cambios mostrados en mayúsculas corresponden a mutaciones de tipo sinónimas.

Residuo AA:	1432	1454	1466	1476	1482	1490	1491	1493	1494	1495	1496	1501	1504	1505	1506	1507	1508	1509	1510	1511	1513	
AA Sal-I	Ser/Pro	Ile/Leu	Met/Lys	Thr/Ala	Gly/Glu	Asp/Thr	Gly/Ala	Lys/Asn	Thr/Ala/Glu*	Glu/Gln	Ile/Val	Asp/Ala	Lys/Asn	Lys/Thr/Ala*	Gln/His/Glu*	Asp/Asn	Glu/Asp	Glu/Lys	Leu/Ile	Lys/Gln	Leu/Ile	
Codón Sal-I	tca	ata	atg	acc	ggg	gat	gga	aaa	aca	gag	att	gat	aaa	aag	caa	gat	gag	gaa	ctt	aaa	tta	
Haplotipo	n																					
N1	39	...	C..	.a.	
N2	29	...	C..	.a.	g.G	.a.	ac.	.c.	.t	g..	C..G	
N3	9	C..	C..	.a.	g.G	.a.	ac.	.c.	.t	g..	C..G	...	a..	
N4	6	g.G	.a.	ac.	.c.	.t	ga.*	...	g..	.c.	...	gca*	g..*t	a.G	a..	...	a..
N5	3	...	C..	.a.	g.G	.a.	ac.	.c.	.t	g..	C..c	.ca	.t	a..	...	a.G	...	C..	...	
N6	1	...	C..	.a.	
N7	1a.	ac.	.c.	.t	g..	C..c	.ca	...	a..G	a..	
N8	1	...	C..	.a.	g.G	.a.	ac.	.c.	.t	g..	C..G	a..	
Codón Belem	C..	C..	.a.	ac.	.c.	.t	ga.	...	g..	.c.	...	gca	g..t	ag	a..	...	a..	

Residuo AA:	1514	1515	1516	1517	1518	1519	1520	1521	1522	1524	1525	1526	1527	1528	1529	1530	1533	1538	1564	1566	1570	1586	
AA Sal-I	Gly/Glu	Asn/Ser	Val/Glu/Asp*	Asn/Ala/Val*/Ser+	Ser/Asn/Thr*	Gln/Lys	Asp/Thr/Asn*/Ala+	Ser/Ala/Thr*	Lys/Glu	Asn/Ala/Thr*	Glu/Lys/Gln*	Phe/Ser	Ile/Thr/Met*	Ala	Lys/Gln	Lys	Leu	Pro	Val	Asn/Ser	Leu/His	Asn/Thr	
Codón Sal-I	gga	aat	ggt	aac	agt	caa	gat	agt	aaa	aac	gaa	ttt	att	gcc	aaa	aag	ctg	ccg	gtc	aac	ctg	aac	
Haplotipo	n																						
N1	39	
N2	29	.a.aa	gc.	.a.	a..	ac.	gc.	g..	gct	a..c.	
N3	9	.a.aa	gc.	.a.	a..	ac.	gc.	g..	gct	a..c.	
N4	6	.a.aa	gc.	.a.	a..	.c.+	gc.	g..	.c.*	c..*	.c.G	.g.*	
N5	3g.	.aa	gt.*	a..*	...	g..	.c.*	c..*	.c.G	.g.*	
N6	1	
N7	1	.a.a.*	.g.+	.c.*	a..	ac.	.c.*	g..	gct	a..c.	
N8	1	.a.aa	gc.	.a.	a..	ac.	gc.	g..	gct	a..c.	..A	C..	..A	T..	..A	..TaT	.c.
Codón Belemg.	.a.	.g.	.c.	a..	ac.	.c.	g..	.c.	C..	.c.G	.g	

Residuo de AA: posición del residuo

* Los aminoácidos se representan en código de tres letras.

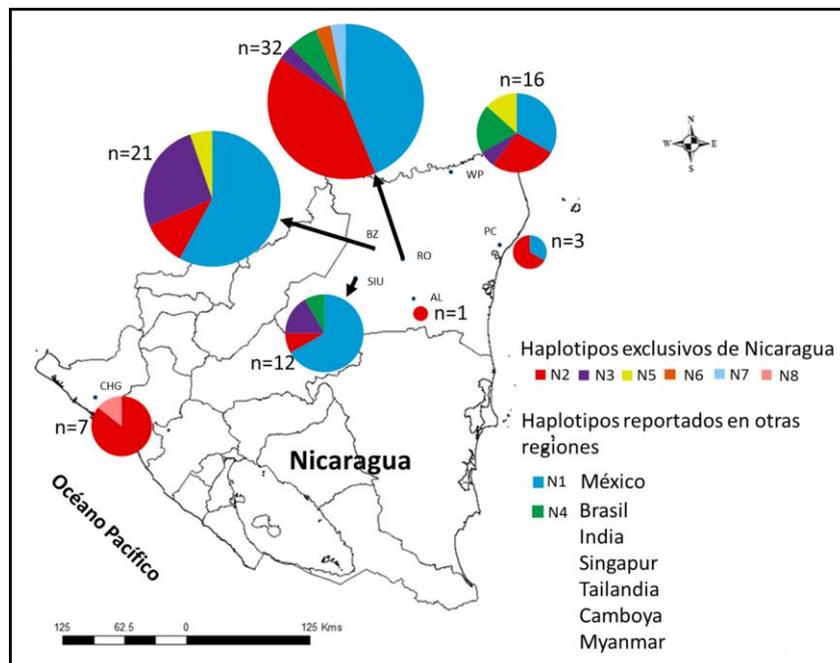
* Los símbolos: *, +, ubicados junto a los aminoácidos se corresponden con los ubicados en los codones.

En las 89 secuencias de Nicaragua se encontraron 59 sitios polimórficos y 51 de estos fueron de tipo no sinónimo, mientras que los cambios sinónimos fueron nueve (Tabla 1). Los países en los que se encontró mayor cantidad de sitios polimórficos (59) son: Myanmar, India y Nicaragua con 28, 29 y 89 muestras respectivamente.

Diversidad genética.

De los ocho haplotipos encontrados en Nicaragua seis son exclusivos de este país (Haplotipos: N2, N3, N5, N6, N7 y N8), mientras que dos se han detectado en otros países (haplotipo N1 en parásitos del Sur de México y el haplotipo N4 encontrado en Brasil, India, Singapur, Tailandia, Camboya y Myanmar). El haplotipo N2 se encuentra distribuido en todos los municipios de Nicaragua, los haplotipos N1, N3 y N5 son exclusivos de la zona del RAAN, mientras que los haplotipos N7 y N6 sólo se detectaron en Rosita. El haplotipo N8 fue exclusivo de Chinandega. (Figura 1).

Figura 1. Distribución geográfica de los haplotipos del fragmento *msp142* de *P. vivax* encontrados en los municipios de Nicaragua: Rosita (RO), Bonanza (BZ), Waspam (WP), Siuna (SIU), Puerto Cabezas (PC), Alamikamba (AL) y Chinandega (CHG). Cada haplotipo está representado por un color y su frecuencia con respecto al total de muestras. La n representa el tamaño de muestra.

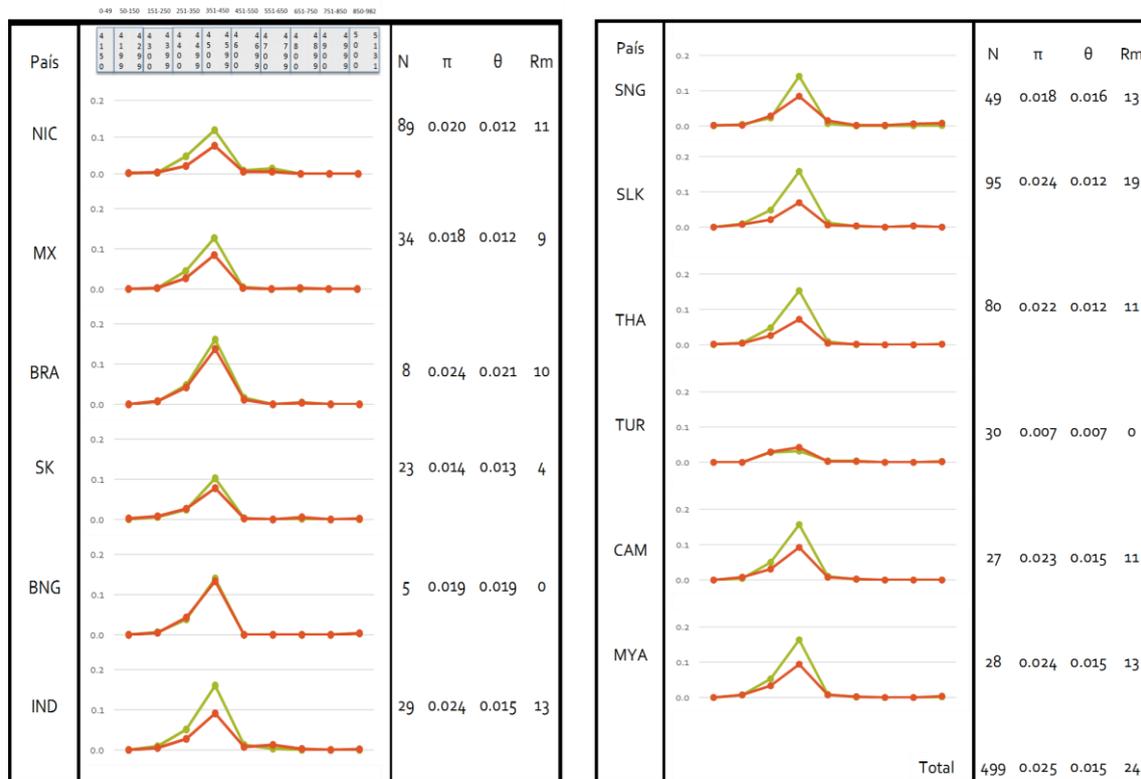


P. vivax de Nicaragua mostró una diversidad genética ($\pi = 0.020$; $\theta = 0.012$) semejante a la diversidad de México ($\pi = 0.018$, $\theta = 0.012$) India ($\pi = 0.024$, $\theta = 0.015$) y Tailandia ($\pi = 0.022$, $\theta = 0.012$), la diversidad más baja de todos los sitios geográficos

analizados fue para los parásitos de Turquía ($\pi = 0.007$, $\theta = 0.007$). La diversidad de estos países es semejante a los que tienen un tamaño de muestra más grande: Tailandia ($\pi = 0.022$, $\theta = 0.012$) y Sri Lanka ($\pi = 0.024$, $\theta = 0.012$). La diversidad se concentra principalmente entre los nucleótidos 4400-4600. Los valores más altos se hallan entre los nucleótidos 4500-4600 en ambos indicadores (π y θ) y en todos los países. El país con mayor diversidad es Brasil con $\pi=0.024$ y $\theta=0.021$. En el análisis por ventanas traslapadas del fragmento que presenta mayor diversidad es *mspI*₃₃ tiene un comportamiento similar para los parásitos de distintos países.

El número de haplotipos calculado para el fragmento *mspI*₄₂ a nivel global fue de 99, mientras que la diversidad genética de π fue 0.025 y de θ fue 0.015 (figura 2).

Figura 2. Gráficas y valores de diversidad nucleotídica (línea verde = π , línea café = θ), por ventanas traslapadas de 100 nucleótidos y 50 de traslape. Número de secuencias analizadas (N) y número de sitios mínimos de recombinación (Rm) del fragmento *mspI*₄₂ de *P. vivax* por cada país: Nicaragua (NIC), México (MX), Corea del Sur (SK), Bangladesh (BNG), Brasil (BRA), India (IND), Singapur (SNG), Sri Lanka (SLK), Tailandia (THA), Turquía (TUR), Camboya (CAM) y Myanmar (MYA).

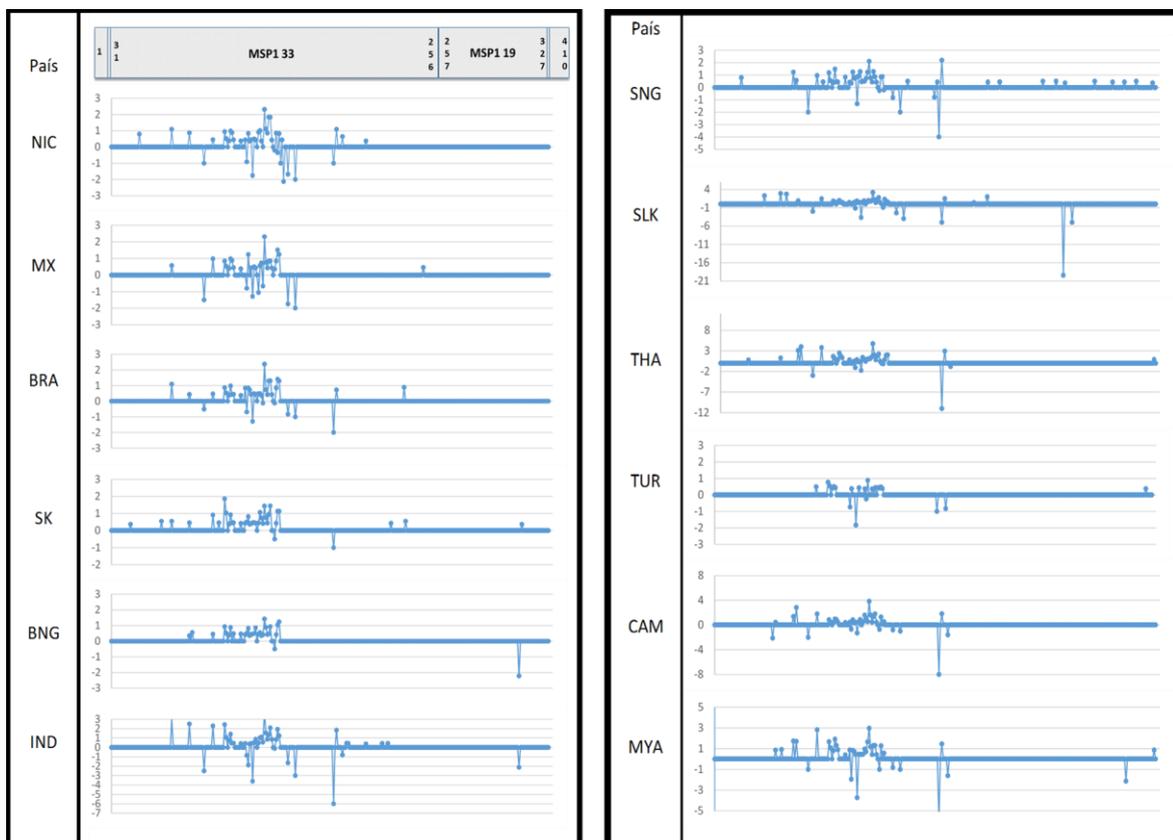


Selección Natural y Recombinación.

Los valores de dN/dS encontrados en los aislados de Nicaragua 29 sustituciones fueron mayores a cero y sólo 10 fueron menores a cero. La proporción de sustituciones no sinónimas, al igual que lo encontrado en parásitos de otros países, fue significativamente mayor que las sinónimas.

El fragmento *mspI*₃₃ está fuertemente sometido a selección positiva. Sin embargo en algunos codones, para la mayoría de los países, se observó que la proporción de sustituciones sinónimas es mayor que las no sinónimas, lo que podría evidenciar selección negativa (Figura 3). En todos los países incluyendo Nicaragua, excepto Bangladesh y México, la mutación en el aminoácido 181 resultó en una dN/dS negativa, lo que podría indicar una selección de tipo purificadora.

Figura 3. Gráficas de valores dN/dS en el fragmento *mspI*₄₂ de *P. vivax* por país de procedencia: Nicaragua (NIC), México (MX), Corea del Sur (SK), Bangladesh (BNG), Brasil (BRA), India (IND), Singapur (SNG), Sri Lanka (SLK), Tailandia (THA), Turquía (TUR), Camboya (CAM) y Myanmar (MYA).



En cuanto al fragmento *mspI19* de las muestras de Nicaragua, no se revelaron polimorfismos. Esta ausencia de polimorfismo se observó también en México, Brasil y Camboya. Por otro lado, en Corea del Sur, Turquía y Singapur se detectó selección de tipo positiva (Figura 3). Finalmente, en India, Bangladesh y Myanmar se detectó selección negativa en la posición 307.

En general, contemplando todo el fragmento secuenciado se evidenció que en Corea del Sur y Bangladesh hay menos sitios con selección negativa en comparación con los demás países.

Diferenciación genética (F_{ST})

En la tabla 2 se muestran los valores de diferenciación a través del índice de F_{ST} , al comparar las diferentes regiones de Nicaragua. El valor más bajo de F_{ST} se presenta cuando se comparan los municipios de Rosita y Waspam con un valor de 0.00253, seguido de Siuna con Puerto Cabezas_Alamikamba con un valor de 0.00523. Por otro lado, los valores más altos se registraron al comparar la región de la Chinandega con cuatro municipios de la región del RAAN (Bonanza 0.55592, Rosita 0.4307, Waspam 0.36527 y Siuna 0.6124). En general se observa que hay una estructura poblacional entre los parásitos muestreados en la región del Atlántico (RAAN) con la región del Pacífico (Chinandega).

Tabla 2. Valores de diferenciación (F_{ST}) del fragmento *mspI42* de *P. vivax* de los distintos municipios de Nicaragua: Rosita (RO), Bonanza (BZ), Waspam (WP), Siuna (SIU), Puerto Cabezas (PC), Alamikamba (AL) y Chinandega (CHG).

	BZ	RO	WP	SI	PC_AL
RO	0.00735				
WP	0.04845	0.00253			
SI	0.04816	0.01476	0.06626		
PC_AL	0.07847	0.16315	0.1021	0.00523	
CHG	0.55592	0.4307	0.36527	0.6124	0.13950

En la tabla 3 se muestran los índices F_{ST} para el fragmento *mspI42* entre parásitos de *P. vivax* de Nicaragua y otros países. Los valores de F_{ST} más bajos fueron encontrados al comparar Nicaragua con Brasil (0.0948), Sri Lanka (0.1299), e India (0.1506).

Mientras, que los índices de diferenciación más altos al compararlos son Nicaragua con Singapur (0.3669), Bangladesh (0.4020), Corea del Sur (0.4335) y Turquía (0.4822). Corea del Sur fue quien presentó los valores más altos al comparar con Bangladesh (0.7978) y Turquía (0.5750). Los índices más bajos se observan entre Brasil-Sri Lanka (0.0029), Sri Lanka-India (0.0039) y Myanmar-Tailandia (0.0093). Los valores de F_{ST} demuestran que no existe una estructuración en relación a la distancia geográfica, por ejemplo, el valor encontrado al comparar México con Nicaragua es de 0.23, mientras que los índices de las comparaciones entre México con India, Sri Lanka y Brasil con India, Camboya y Myanmar son más bajos (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de diferenciación (F_{ST}) del fragmento *mspI42* entre *P. vivax* de diferentes países: Nicaragua (NIC), México (MX), Corea del Sur (SK), Bangladesh (BNG), Brasil (BRA), India (IND), Singapur (SNG), Sri Lanka (SLK), Tailandia (THA), Turquía (TUR), Camboya (CAM) y Myanmar (MYA)..

	NIC	MX	SK	BNG	BRA	IND	SNG	SLK	THA	TUR	CAM
MX	0.2328										
SK	0.4335	0.3428									
BNG	0.4020	0.2942	0.7978								
BRA	0.0948	0.0510	0.2125	0.1724							
IND	0.1506	0.0697	0.1849	0.1205	0.0245						
SNG	0.3669	0.2332	0.3676	0.1854	0.2333	0.1461					
SLK	0.1299	0.0915	0.2607	0.1894	0.0029	0.0039	0.1614				
THA	0.1955	0.1795	0.3320	0.2081	0.0888	0.0447	0.1176	0.0360			
TUR	0.4822	0.1397	0.5750	0.4844	0.2911	0.2888	0.4071	0.3022	0.3791		
CAM	0.2302	0.2023	0.2033	0.0956	0.0274	0.0283	0.1801	0.0619	0.0536	0.4199	
MYA	0.1929	0.1705	0.2576	0.1232	0.0669	0.0200	0.0947	0.0268	0.0093	0.3597	0.0214

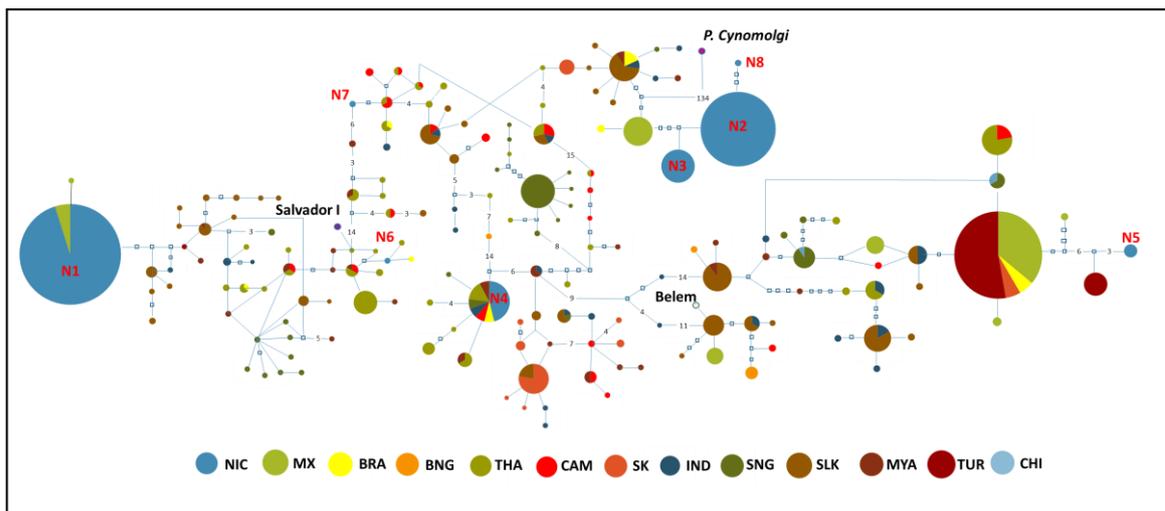
Red de haplotipos.

En la reconstrucción genealógica (Figura 4) se observan seis grupos genealógicos para los ocho haplotipos encontrados en Nicaragua. El haplotipo N1, el más frecuente y distribuido en la región del RAAN, se detectó en los *P. vivax* del Sur de México en 2 de las 34 muestras. El haplotipo N4 de Nicaragua forma un grupo genealógico distinto con Brasil, Camboya, India, Singapur, Tailandia y Myanmar. Los haplotipos N6 y N7 exclusivos de Nicaragua se encuentran más emparentados con parásitos de Brasil, Camboya, Tailandia y Myanmar. El haplotipo N5 también es exclusivo de Nicaragua pero

está separado por sólo 3 pasos mutacionales de un grupo de Turquía y por 12 pasos mutacionales de un haplotipo frecuente y compartido entre México, Brasil, Corea del Sur y Turquía. Los haplotipos N2, N3 y N8 forman un grupo muy cercado, separado por dos pasos mutacionales de un grupo de parásitos de México; los haplotipos N2 y N3, y N2 y N8 se encuentran separados por uno y dos pasos mutacionales, respectivamente. El haplotipo N8 que sólo se detectó en la región de Chinandega se encuentra separado por dos pasos mutacionales del haplotipo N2, el cual se encontró distribuido en todos los municipios del RAAN en Nicaragua.

Las cepas Salvador I y Belem se usaron como secuencias de referencia para conocer su ubicación en la genealogía. La primera está más relacionada con parásitos de Tailandia, Brasil, Myanmar y los haplotipos de Nicaragua N1 y N6, mientras que la segunda está más estrechamente relacionada con parásitos de Sri Lanka, India, Bangladesh y México. El haplotipo de la especie de *Plasmodium cynomolgi* se conecta, después de 136 pasos mutacionales, con parásitos de México, Sri Lanka, Brasil, India y Myanmar.

Figura 4. Red de haplotipos con las relaciones del fragmento *mspI42* de los parásitos de *P. vivax* circulantes en Asia y América. Cada círculo indica un haplotipo distinto (n=499). Cada color representa el país de procedencia. El tamaño del círculo es proporcional al número de aislados que presentan ese haplotipo. Las líneas conectan los genotipos relacionados y los cuadros pequeños y números indican el número de pasos mutacionales correspondientes entre dos haplotipos. Ver la figura ampliada en anexo 1.



DISCUSIÓN

Históricamente, el paludismo ha sido una enfermedad endémica en Nicaragua, donde *P. falciparum* y *P. vivax* son las especies que prevalecen en la Región del Atlántico Norte (RAAN) que fronteriza con Honduras y con menor incidencia en la zona Pacífico cercana a la frontera con El Salvador. Aunque se encuentra en fase de control, se estima que a mediano plazo podría avanzar a la etapa de pre-eliminación (CNDR-MINSA Nicaragua, 2008).

En los 89 parásitos de *P. vivax* analizados de las zonas afectadas de Nicaragua se encontraron ocho haplotipos para el fragmento *msh142*, de los cuales seis son exclusivos de este país. La diversidad genética restringida al fragmento *msh133*, fue comparable con la reportada para otros países con similar situación epidemiológica, además la población humana tiene una marcada actividad migratoria (OIM 2012), principalmente la zona del RAAN, fronteriza con una zona de narcotráfico y alto tráfico aéreo ilegal que aterriza proveniente de América del Sur, sin mencionar que la transmisión del paludismo está dispersa en comunidades de difícil acceso con retraso en el desarrollo socioeconómico y social que dificultan el diagnóstico y tratamiento, y por último la presencia de casos recurrentes por recaídas. Estos son factores que contribuyen a la alta diversidad genética, la presencia de genotipos nuevos producto de diversificación local y varios linajes de haplotipos originados en distintas regiones del mundo. Un estudio reciente en Honduras también mostró alta diversidad en los genes *ama-1*, *csp* y *msh1f2* de *P. vivax* (Lopez et al. 2012). Por otro lado, en el Sur de México que comparte frontera con Guatemala, zona con mayor transmisión del país, se encontraron ocho haplotipos en 34 parásitos analizados y una diversidad genética similar a la encontrada en el presente estudio, aunque sólo se comparte un haplotipo (N1) siendo el más frecuente en Nicaragua con 39 aislamientos y en el Sur de México con sólo dos aislamientos (Corzo 2013).

La base de datos de la OPS (PAHO 2012), muestra que México y Nicaragua han disminuido considerablemente el número de casos en el periodo de 1996 a 2012, de 48,800 a 4159 y de 73,000 a 999 casos, respectivamente. Por otro lado el número de casos de Honduras en 1996 y 2012 fue de 73,313 y 5000 en ese orden. Aunque en Honduras la zona más afectada y que enfrenta dificultades para el control es la de conflicto por el tráfico ilegal.

La diversidad genética tan marcada y la diversificación local en el gen *mssl42* entre los aislados del mundo ha resultado el mayor obstáculo en el desarrollo de una vacuna efectiva contra el paludismo. De toda la proteína, el fragmento *mssl42* ha resultado ser el antígeno candidato a vacuna más exitoso y actualmente las evaluaciones clínicas se encuentran en estado avanzado (Ellis et al. 2010; Malkin et al. 2007; Ogutu et al. 2009; Huaman et al. 2008). Sin embargo, la acelerada dinámica evolutiva del parásito implicaría llevar a cabo cambios frecuentes en la vacuna y una continua vigilancia de la diversidad genética y antigénica de los parásitos circulantes (Kang et al. 2012). Además de que el subfragmento *mssl33* es altamente diverso en comparación con *mssl19*, se detectaron algunos codones con polimorfismos únicos que pueden estar sujetos a diferentes presiones de selección. Por ejemplo, Nicaragua muestra un haplotipo único (N8) en la región de la Chinandega, el cual tiene varios cambios de tipo sinónimo en los codones 1476, 1509, 1526, 1528, 1530, 1533, 1538, 1564 y 1570 del subfragmento *mssl33*. Este haplotipo al parecer se originó en esta región de Nicaragua ya que existen otros dos haplotipos genealógicamente cercanos que también son exclusivos Nicaragua.

El coeficiente de las proporciones de las mutaciones sinónimas y no sinónimas (dN/dS) fue usado como un indicador de la acción de la selección natural en el gen en estudio. Una proporción considerable de las sustituciones no sinónimas con respecto a las sinónimas en el fragmento *mssl33* revelo que la mayoría de las sustituciones pueden estar sujetas a selección positiva (Putapornitip et al. 2002; Thakur et al. 2008; Dias et al. 2011). De los valores de dN/dS encontrados en los aislados de Nicaragua 29 sustituciones fueron mayores a cero y sólo 10 fueron menores a cero. Al comparar estos resultados con los obtenidos en México se observa un resultado similar, 24 y 7 sustituciones fueron mayores y menores de cero respectivamente. Sin embargo, los sitios dentro del fragmento *mssl33* donde ocurren estas sustituciones entre estos dos países son diferentes lo que sugiere que las presiones selectivas locales pueden ser diferentes a pesar de la cercanía geográfica. En relación a otros países fuera de América se observa la misma dinámica: el subfragmento *mssl33* está sujeto a presiones selectivas de tipo positivas pero en cada país hay sustituciones únicas. Estos resultados confirman que este fragmento al codificar para varios epítomos B y T, funcionalmente está relacionado con la respuesta inmune en el humano (Dias et al. 2011; Huaman et al. 2008; Pacheco et al. 2008).

Para entender el proceso de transmisión, patogénesis y resistencia a medicamentos en *P. vivax*, es necesario determinar cómo se originan, se dispersan y moldean las

relaciones genealógicas observadas en la red de haplotipos. Usando herramientas de genética de poblaciones es posible determinar la compleja dinámica evolutiva de *P. vivax* para proponer y evaluar métodos para el control y la eliminación que disminuyan no solo el número de individuos, también que eviten la generación de variación genética (Putaporntip et al. 2002). La reconstrucción genealógica a partir de la red de haplotipos de Nicaragua y las previamente descritas de diferentes regiones del mundo revelaron que los parásitos de *P. vivax* de Nicaragua forman seis grupos distintos que se encuentran separados genealógicamente entre ellos por muchos pasos mutacionales y por haplotipos reportados en otras regiones del mundo. Esta discontinuidad genealógica sugiere que algunos haplotipos provenientes de otras regiones del continente han sido introducidos incluso de otras regiones de Asia y Medio Oriente. Los haplotipos N2, N3 y N8 se encuentran a menos de dos pasos mutacionales entre ellos y dado que el haplotipo N8, exclusivo de la región de Chinandega, está conectado únicamente con el haplotipo N2 y distribuido en las zonas afectadas de Nicaragua, se puede inferir que el primero se originó a partir del segundo. Además, su aparición es relativamente reciente ya que sólo están separados por dos pasos mutacionales. Recientemente, *mssl42* fue categorizado en 12 grupos basados en las diferencias observadas en la región hipervariable, sin embargo no existe correlación entre estos grupos con los datos geográficos a nivel global ya que de las 202 secuencias provenientes de distintos países los grupos formados por análisis filogenético son heterogéneos (Dias et al. 2011). Esta afirmación se soporta con la reconstrucción genealógica aquí propuesta: si bien hay algunos haplotipos de Nicaragua (N1, N2, N3, N8) que están relacionados con haplotipos de México ya que se ubican en grupos separados por unos pocos pasos mutacionales (de 2 a 11 pasos), hay algunos otros haplotipos compartiéndose con regiones geográficamente distantes. Tal es el caso del haplotipo N5, que se encuentra más relacionado con algunos haplotipos de México, Brasil, Corea del Sur y Turquía; de los haplotipos N6 y N7, que se hallan más próximos a algunos haplotipos que circulan en América, como se ha visto para otros genes como *csp*, mientras otros genotipos están más relacionados a los haplotipos de otros continentes. El haplotipo N4 el cual se encuentra en Brasil, Camboya, India, Singapur, Tailandia y Myanmar. Es posible que esta variante sea un haplotipo muy ancestral que se ha dispersado en casi todo el mundo, lo que sugiere que *P. vivax* en Nicaragua presente una misma dinámica evolutiva como lo han sugerido para otros sitios geográficos (Cerritos et al. 2014; Dias et al. 2011; Han et al. 2011; Kang et al. 2012; Putaporntip et al. 2002; Putaporntip et al. 2000; Thakur et al. 2008; Corzo 2013; Lopez et al. 2012). En este caso,

como las campañas de eliminación de paludismo modifican drásticamente la frecuencia de haplotipos de la zona, un mejor parámetro para definir las fases en la que se encuentran los países tendría que ser el monitoreo de los parámetros genéticos. La selección de tipo positiva en estos genes, el alto grado de recombinación y una alta tasa de dispersión del hospedero humano, provoca la estructura genética que se observa en este trabajo. Si los genotipos circulantes migran de una región a otra continuamente la diversidad genética se incrementa, lo que puede dificultar el control de la enfermedad a pesar de los continuos esfuerzos de los programas de control.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahlborg, N. et al., 2002. Protective Immune Responses to the 42-Kilodalton (kDa) Region of Plasmodium yoelii Merozoite Surface Protein 1 Are Induced by the C-Terminal 19-kDa Region but Not by the Adjacent 33-kDa Region. , 70(2), pp.820–825.
- Alexandre, M. a et al., 2010. Severe Plasmodium vivax malaria, Brazilian Amazon. *Emerging infectious diseases*, 16(10), pp.1611–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3294402&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 3, 2014].
- Arnott, A., Barry, A.E. & Reeder, J.C., 2012. Understanding the population genetics of Plasmodium vivax is essential for malaria control and elimination. *Malaria Journal*, pp.1–10.
- Babon, J.J. et al., 2007. Structural studies on Plasmodium vivax merozoite surface protein-1. *Molecular and biochemical parasitology*, 153(1), pp.31–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17343930> [Accessed July 9, 2014].
- Cerritos, R. et al., 2014. Genetic structure of Plasmodium vivax using the merozoite surface protein 1 icb5-6 fragment reveals new hybrid haplotypes in southern Mexico. *Malaria journal*, 13, p.35. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3923247&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 9, 2014].
- Cheng, Y. et al., 2013. The Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 paralog is a novel erythrocyte-binding ligand of P. vivax. *Infection and immunity*, 81(5), pp.1585–95. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3648005&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 6, 2014].
- Corzo, J., 2013. *Diversidad genética y antigénica de moléculas candidatos para vacunas (dbpII, amaII-II y msp142) del merozoíto de Plasmodium vivax del Sur de México*. Instituto Nacional de Salud Pública.
- Cui, L. et al., 2003. The genetic diversity of Plasmodium vivax populations. *Trends in parasitology*, 19(5), pp.220–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24533989>.
- Dias, S. et al., 2011. Genetic diversity and recombination at the C-terminal fragment of the merozoite surface protein-1 of Plasmodium vivax (PvMSP-1) in Sri Lanka. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 11(1), pp.145–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20933611> [Accessed July 9, 2014].
- Ellis, R.D. et al., 2010. Blood stage vaccines for Plasmodium falciparum : Current status and the way forward. *Human Vaccines*, 6(8), pp.627–634. Available at: <http://www.landesbioscience.com/journals/vaccines/article/11446/> [Accessed August 3, 2014].

- Fleck, S.L. et al., 2003. Suramin and suramin analogues inhibit merozoite surface protein-1 secondary processing and erythrocyte invasion by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The Journal of biological chemistry*, 278(48), pp.47670–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13679371> [Accessed August 6, 2014].
- Guerra, C. a et al., 2010. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLoS neglected tropical diseases*, 4, p.e774.
- Han, E.-T. et al., 2011. Genetic diversity of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium vivax* field isolates in Republic of Korea. *Parasitology research*, 109(6), pp.1571–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21556687> [Accessed August 2, 2014].
- Holder, A. et al., 1992. A malaria merozoite surface protein MSP-1 Structure processing and function. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 87, pp.37–42.
- Huaman, M.C. et al., 2008. Ex Vivo Cytokine and Memory T Cell Responses to the 42-kDa Fragment of *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein-1 in Vaccinated Volunteers. *The Journal of Immunology*, 180(3), pp.1451–1461. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.180.3.1451> [Accessed August 3, 2014].
- Kang, J.-M. et al., 2012. Genetic polymorphism and natural selection in the C-terminal 42 kDa region of merozoite surface protein-1 among *Plasmodium vivax* Korean isolates. *Malaria journal*, 11(1), p.206. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3487983&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 2, 2014].
- Librado, P. & Rozas, J., 2010. DnaSP.
- Lopez, A.C. et al., 2012. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* in Honduras. *Malaria journal*, 11(1), p.391. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3519596&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 29, 2013].
- Maestre, A. et al., 2004. Inter-allelic recombination in the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 gene among Indian and Colombian isolates. *Malaria Journal*, 6, pp.1–6.
- Malkin, E. et al., 2007. Phase 1 study of two merozoite surface protein 1 (MSP1(42)) vaccines for *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS clinical trials*, 2(4), p.e12. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1847697&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 3, 2014].
- Mendis, K. et al., 2001. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 64, pp.97–106.
- Miahipour, A. et al., 2012. Genetic variation of MSP-1 Gene in *Plasmodium vivax* Isolated from Patients in Hormozgan Province, Iran using SSCP-PCR. *Iranian J Parasitol.*, 7, pp.1–7.

- Ogutu, B.R. et al., 2009. Blood stage malaria vaccine eliciting high antigen-specific antibody concentrations confers no protection to young children in Western Kenya. *PloS one*, 4(3), p.e4708. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2650803&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 3, 2014].
- OIM, 2012. Perfil migratorio de Nicaragua. *Organización Internacional para las Migraciones*, p.218.
- Pacheco, M.A. et al., 2008. A comparative study of the genetic diversity of the 42 kDa fragment of the merozoite surface protein-1 in *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Infect Genet Evol.*, 2007, pp.180–187.
- PAHO, 2012. Interactive Malaria Statistics. Available at: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=2632&Itemid=2130&lang=en.
- Putaporntip, C. et al., 2000. Intragenic recombination in the 3' portion of the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium vivax*. *Molecular and biochemical parasitology*, 109(2), pp.111–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10960170>.
- Putaporntip, C. et al., 2002. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(25), pp.16348–53. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=138614&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Tamura, K. et al., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.
- Thakur, A., Alam, M.T. & Sharma, Y.D., 2008. Genetic diversity in the C-terminal 42 kDa region of merozoite surface protein-1 of *Plasmodium vivax* (PvMSP-1(42)) among Indian isolates. *Acta tropica*, 108(1), pp.58–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18823930> [Accessed July 9, 2014].
- Zakeri, S. et al., 2006. Population structure analysis of *Plasmodium vivax* in areas of Iran with different malaria endemicity. , 74(3), pp.394–400.

ANEXO 1.

