

# **INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA**

---

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

## **TESIS**

**“Análisis temporal de las variantes antigénicas de la Proteína de Unión  
al Receptor Duffy (*PvdbpII*) de *Plasmodium vivax* del Sur de México”**

**Requisito parcial para obtener el grado de:  
Maestro en Ciencias de la Salud con Área de Concentración en  
Enfermedades Transmitidas por Vector**

**Presenta:**

**Q.F.B. Carlos Adolfo Espinosa González**

**Directora de tesis:**

**Dra. Lilia González Cerón**

**Asesor: Dr. René Cerritos Flores**

**Lector: Dr. Mario Henry Rodríguez López**

**Tapachula, Chiapas**

**Agosto 2015**

**Análisis temporal de las variantes antigénicas de la Proteína de Unión al  
Receptor Duffy (*PvdbpII*) de *Plasmodium vivax* del Sur de México**

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. Carlos Adolfo Espinosa González

Agosto 2015

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

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lilia González Cerón. Gracias por permitirme formar parte de su proyecto y compartir parte de sus conocimientos y experiencia en el área. Trabajar con usted ha sido una gran experiencia para mi formación profesional. Gracias por su tiempo dedicado en mi trabajo, por sus consejos y regaños que sé, servirán para formarme como profesional y como persona; gracias por abrirme las puertas de su casa y explorar nuevos horizontes, en verdad fue una experiencia inolvidable, además, a parte de mi directora de tesis, usted fue una gran amiga y espero que este lazo perdure por siempre. La aprecio bastante Doctora y le deseo siempre lo mejor para usted y su familia. Finalmente hay una frase que me recuerda mucho a usted: “Para hacer grandes cosas, para lograr grandes objetivos, tienes que estar dispuesto a hacer cosas que la gente normal rara vez hace”

A mi Asesor: el Dr. Rene Cerritos Flores, le agradezco su tiempo, sus valiosas aportaciones y conocimientos que me compartió sobre genética de poblaciones para mi trabajo de tesis y mi formación. Gracias por la oportunidad que me brindo para asistir al curso que usted impartió el curso sobre evolución y ecología de microorganismos patógenos en la UNAM. Por sus comentarios y sugerencias sobre la tesis y por formar parte en el comité de evaluación

Al Dr. Mario Henry Rodríguez. Le agradezco por su valiosa contribución en la revisión de la tesis, sus comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo y por formar parte del comité de evaluación.

Al personal del Laboratorio de Inmunoparasitología molecular del CRISP: a la QFB. Frida Santillán Valenzuela, gracias por sus valiosos consejos y dirección durante mi trabajo dentro del laboratorio, si he mejorado mi desempeño dentro del laboratorio es gracias a usted y a que siempre estuvo a un lado apoyándome; al QFB. Marco Alessio Sandoval Bautista, gracias por estar al pendiente de mi trabajo y apoyarme en los momentos más complicados del mismo; A la Química Olga y a la Lic. Orfi, gracias por su apoyo y por compartir gratos momentos durante este tiempo.

A mi tutor: Maestro José Genaro Ordoñez González, gracias por su tiempo y por estar siempre al pendiente de mí.

A la Dra. Teresa López Ordoñez, gracias por su tiempo y disposición para ayudarnos en todo lo que necesitábamos, gracias por su amistad y ser como nuestra segunda madre.

## **DEDICATORIAS**

A Dios mi padre, por permitirme estar de pie hasta el día de hoy y por ser mi principal motor en mi vida. "Encomienda a Jehová tus obras, Y tus pensamientos serán afirmados." (Proverbios 16:3.)

A mis padres: José Adán Espinosa Altúzar y Areli Noremi González Roblero, no hay camino en la que ustedes no me hayan acompañado, no hay caída de la que no me hayan levantado, agradezco a Dios por permitir tenerlos a ambos en mi vida y formar parte de cada momento, sea bueno o sea malo. Mis victorias son sus victorias también, y compartir este momento con ustedes me llena de dicha y alegría. Papá si quisiera ser un súper héroe definitivamente escogería ser Súper Adán, eres un hombre maravilloso, que no desmayas ante las pruebas difíciles de la vida, hombre honesto como nadie más en el mundo, fiel a su pareja y amoroso hacia sus hijos, solo tú eres mi súper héroe. Mamá gracias por hacer de mi un hombre de bien, que ama lo que hace y lo hace con dedicación. A los dos los amo infinitamente, son mi más grande orgullo.

A mi hermano Daniel. Ser hermano mayor no es fácil, tienes que ser ejemplo y espero poder inculcar en ti parte de lo que he logrado, sea poco o sea mucho, solo tú sabrás valorarlo. Te amo hermano y siempre es grato contar contigo.

A mi hermosa novia: Sheyla Karina Flores Güirao, gracias porque un día me diste la oportunidad de entrar a tu corazón y compartir conmigo parte de tu vida; ser mi apoyo incondicional durante todo este tiempo y acompañarme cada noche de desvelo, siempre estuviste conmigo. Mujer virtuosa, ¿quién la hallará? Porque su estima sobrepasa largamente a la de las piedras preciosas. El corazón de su marido está en ella confiado, Y no carecerá de ganancias. Le da ella bien y no mal Todos los días de su vida (Proverbios 31: 10-12). Te amo princesa, eres mi inspiración.

A la familia Flores Güirao, por estar siempre al pendiente de mí y por el cariño que han compartido hacia mí y hacia mi familia. Amado, yo deseo que tú seas prosperado en todas cosas, y que tengas salud, así como tu alma está en prosperidad. (3 Juan 1:2).

A mis amigos y hermanos, Keila (churris), Adriana (flaquita), Evaristo (morenito), juntos pasamos momentos inolvidables, gracias por su apoyo incondicional y compañía fueron indispensables para poder llegar a la meta, siempre los recordare y el cariño hacia ustedes se mantendrá durante toda mi vida. Sin olvidar a Hugo, Sleidher, Oscarin y Luis, gracias por su amistad.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
2.1 Origen de las Muestras.....	5
2.1.1 Amplificación de los fragmentos de genes de la Proteína de unión al Receptor Duffy dominio II ( <i>PvdbpII</i> ) y del marcador mitocondrial Citocromo b ( <i>Pvcitb</i> ).....	5
2.1.2 Purificación y secuenciación.....	7
2.1.3 Revisión y análisis de datos.....	7
2.1.4 Análisis genético de <i>PvdbpII</i> .....	8
2.1.5 Análisis de estructura genética para definir grupos o subpoblaciones basado en los fragmentos <i>PvdbpII</i> y <i>Pvcitb</i> en la muestra del Sur de México.....	9
2.1.5b Diferenciación genética ( $F_{ST}$ ).....	10
2.2. Red de haplotipos para <i>PvdbpII</i> del Sur de México.....	10
2.3. Relación entre los grupos genéticos determinados con los haplotipos <i>PvdbpII</i> y las variantes para los residuos 417-437-503.....	10
III. Resultados.....	11
3.1.1 Polimorfismo genético y distribución temporal de los haplotipos de <i>PvdbpII</i> .....	11
3.1.2 haplotipos de <i>PvdbpII</i> y grupos genéticos o subpoblaciones.....	14
3.2 Agrupamiento de las variantes del gen <i>PvdbpII</i> en los grupos genéticos definidos por el mismo fragmento y por el gen <i>Pvcitb</i> .....	16
3.3 Diferenciación genética de <i>P. vivax</i> .....	17
IV. DISCUSIÓN.....	20
V. BIBLIOGRAFÍA.....	24
VI. LISTA DE ABREVIATURAS.....	27
VII. ANEXOS.....	29

## RESUMEN

**Introducción:** *Plasmodium vivax* es la especie que causa el paludismo más distribuido en el mundo y sólo en América se reportan más de medio millón de casos nuevos cada año. Los estudios de epidemiología molecular y genética de poblaciones pueden ser aplicados en la caracterización de poblaciones de parásitos para la descripción de patrones de transmisión, diseño de vacunas y vigilancia parasitaria. La Proteína de Unión al Receptor Duffy (*PvdbpII*) es un candidato para vacunas, participa en la invasión del merozoíto al reticulocito, capaz de inducir anticuerpos bloqueadores, la cual muestra polimorfismo antigénico. En este estudio se analizaron los cambios en las frecuencias de las variantes para *PvdbpII* con respecto a los residuos 417, 437 y 503, implicados en deriva antigénica, en parásitos del Sur de México.

**Métodos:** Se utilizaron muestras de *P. vivax* de pacientes obtenidas durante 1993-2011. El ADN genómico se utilizó para amplificar por PCR fragmentos de los genes *PvdbpII* y *Pvcitb*. Los productos de PCR se purificaron y secuenciaron por el método de Sanger y se obtuvieron las secuencias consenso. Para *PvdbpII* y por periodo de tiempo se calcularon las frecuencias de haplotipos, de las variantes para los residuos 417-437-503 y los índices de diversidad genética. Con el programa structure se determinaron los grupos genéticos basados en *PvdbpII* y *Pvcitb* y su relación con las variantes *PvdbpII*/417-437-503. Se comparó el índice de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) de *P. vivax* entre la muestra del Sur de México y otros sitios geográficos basado en *Pvcitb* vs *PvdbpII*.

**Resultados:** Se obtuvieron las secuencias consenso de 25, 20 y 22 muestras de los periodos 1993-1994, 2000-2002 y 2010-2011 y se incluyeron 35 secuencias del 2006-2007 ya previamente obtenidas. En las 102 muestras se identificaron 11 haplotipos de *PvdbpII* y cuatro variantes para los residuos 417-437-503; KRK en el 80.4% de los aislados, la frecuencia se incrementó a lo largo del tiempo. Seguimiento del tipo Sal I/ NWI en el 15.68% de los aislados, su frecuencia disminuyó con el tiempo y no fue detectado en el periodo 2010-2011. Los tipos NWK y KWK fueron poco frecuentes. Con el programa structure, se identificaron tres grupos genéticos en base al gen *PvdbpII* (P1, P2 y P3), P1 y P2 se agruparon en un solo grupo *Pvcit b* (I) y mostraron la variante KRK, mientras *PvdbpII* P3 correspondió al grupo genético *Pvcit b* (II) que expresa la variante NWI. Los valores de  $F_{ST}$  entre México y otros sitios geográficos dentro y fuera de América fueron más altos con el marcador *Pvcitb* que con *PvdbpII*.

**Conclusiones:** Los resultados sugieren que *PvdbpII* en el Sur de México es poco polimórfico, y que las variantes NWI y KRK para los residuos 417-437-503 muy probablemente corresponden a grupos genéticos distintos que se diversificaron hace tiempo en la región de estudio o corresponden

a migraciones distintas; las variantes NWK y KWK fueron de baja frecuencia. También se sugiere que la reducción en la frecuencia de la variante NWI y el incremento en la variante KKK fueron eventos independientes. En este primer acercamiento también nos mostró reducción gradual en la diversidad, y pérdida de haplotipos a lo largo del tiempo que concuerda con la reducción en el registro de casos en la región durante el periodo de estudio.

**Palabras Claves:** *Plasmodium vivax*, Proteína de Unión al Receptor Duffy, DBP, diversidad genética, diferenciación genética ( $F_{ST}$ ), grupos o subpoblaciones genéticas, haplotipo, nucleótido, amino ácido, variante antigénica, gen *PvdbpII*, gen *Pvcitb*.

## I. Introducción

*Plasmodium vivax* es el parásito del paludismo más ampliamente distribuido en el mundo, siendo un importante problema de salud pública por su alta morbilidad en las regiones tropicales y subtropicales fuera de África (Jung-Mi *et al.*, 2014). Pese a los notables progresos realizados para su control, el paludismo causado por esta especie sigue siendo una de las enfermedades infecciosas más importantes (WHO, 2014). En la actualidad, se estima que más de 3.3 millones de personas están en riesgo de infección, de los cuales 1.2 millones están en alto riesgo (WHO, 2014). En América, el número de casos confirmados de paludismo en la región se ha reducido de 1,1 millones en el año 2000 a 469 000 casos en el 2012 (OPS, 2013). En México, aunque los casos de paludismo han disminuido considerablemente, aún existen factores que mantienen un alto riesgo de infección en la región; la presencia del vector, condiciones climáticas favorables, la baja inmunidad humana, entre otros (WHO, 2013). Los casos reportados de paludismo en México se encuentran localizados en focos residuales de transmisión; en la costa Norte del Pacífico, en la zona fronteriza entre los estados de Sinaloa, Chihuahua, Sonora y Durango, y en el límite fronterizo de Durango y Nayarit. El tercer foco comprende principalmente en la zona selvática y la zona del soconusco del Estado de Chiapas a lo largo de la frontera con la República de Guatemala, (OPS, 2011).

Los estudios genéticos nos permiten definir la diversidad, la distribución y la dinámica poblacional de *P. vivax* en los sitios afectados, además se ha documentado que las

poblaciones de parásitos difieren ampliamente entre las regiones afectadas (Escalante *et al.*, 2015). La coincidencia de dos o más haplotipos en un mismo vector, permite que al ser la recombinación un evento común para esta especie se generen nuevas variantes por ejemplo en los genes de fases sanguíneas durante la reproducción meiótica. (Arnott *et al.*, 2012). Los antígenos de fases sanguíneas están sometidos a la presión selectiva, por la exposición a la respuesta inmune en el torrente sanguíneo durante la liberación de los merozoítos y el proceso de invasión. La diversidad genética, se detecta principalmente en los segmentos de las moléculas que interactúan con el eritrocito, como parte de un mecanismo de evasión inmune (VanBuskirk *et al.*, 2004; Cole-Tobian *et al.*, 2007).

Los merozoítos de *P. vivax* invaden a los reticulocitos por una serie de procesos complejos de interacción de ligandos del parásito y receptores del hospedero; las principales fases son: I. Unión inicial del merozoíto; II. Reorientación y formación de la unión estrecha merozoíto-reticulocito; III. Entrada del parásito y formación de la membrana parasitofora (Corzo-Mancilla, 2013; Tesis de Maestría/CRISP-INSP). PvDBP participa en la formación de la unión estrecha e irreversible con el receptor de quimiocinas antígeno Duffy (DARC) mediante la unión al dominio extracelular N-terminal de DARC con la región rica en cisteína de PvDBP justo antes de la invasión al reticulocito (Vanbuskirk *et al.*, 2004; Dean, 2005).

La Proteína de Unión al receptor Duffy (DBP) localizado en el cromosoma seis y que codifica una proteína integral de membrana tipo 1 de 140 kDa; en su estructura contiene siete dominios bien definidos: el péptido señal, dos dominios ricos en cisteínas adyacentes amino N-cys y carboxilo C-cys (el dominio II consta de 325 aminoácidos y el VI de 105). Tres dominios hidrofóbicos (el dominio III consta de 156 aminoácidos, el dominio IV de 151 aminoácidos y el dominio V de 111 aminoácidos) y un dominio transmembranal (VII que consta de 63 aminoácidos) (Cole-Tobian, *et al.*, 2003; Vanbuskirk *et al.*, 2004).

El dominio II de DBP de *P. vivax* (*PvdbpII*) es muy inmunogénico y contiene los residuos críticos para el reconocimiento del receptor, pero también contiene la mayor parte de los residuos polimórficos que ocurren dentro de la molécula DBP (Cole-Tobian *et al.*, 2003). Un análisis global de la diversidad genética de *PvdbpII* mostró, que en 511 secuencias analizadas se encontraron 46 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's); los siguientes

presentaron una frecuencia alélica por encima del 10%: R308S, K371E, G384D, E385K, K386N, H390R, **N417K**, L424I, **W437R**, **I503K** y participan en epítomos de células B y T (Nobrega de Sousa *et al.*, 2011). La mayoría detectados en el Sur de México (Corzo-Mancilla, 2013; Tesis de Maestría/CRISP-INSP).

Los polimorfismos N417K, W437R e I503K han sido reportados importantes por afectar la acción de anticuerpos bloqueadores (Vanbuskirk *et al.*, 2004). La inmunización con el fenotipo Sal-I (N417, W437, I503; NWI) protegió contra los parásitos que expresan el haplotipo homólogo; pero los haplotipos dados por las combinaciones de los polimorfismos 417N/K, 437W/R e 503I/K produjeron infecciones en los que la actividad bloqueadora de los anticuerpos inducidos contra el fenotipo NWI fue moderada a nula (ver anexo 2: VanBuskirk *et al.*, 2004). Las variantes genéticas pueden mantenerse o eliminarse dependiendo de las presiones selectivas, sobre todo del hospedero humano (Putaporntip *et al.*, 2002).

Estudios previos en México señalan que la mayoría de los parásitos circulantes son genéticamente únicos comparado con otras regiones, además de tener una estructura genética particular (Gonzalez-Ceron *et al.*, 2013; Cerritos *et al.*, 2014; Corzo-Mancilla, 2013; Tesis de Maestría/CRISP-INSP;). Se ha sugerido la existencia de distintos linajes de *P. vivax* en el Sur de México (Cerritos *et al.*, 2014), y con el uso de microsatélites se han encontrado tres subpoblaciones de *P. vivax* de distinta compatibilidad con las especies de mosquitos simpátricas (Joy *et al.*, 2008). Para definir subpoblaciones de parásitos, su diferenciación y/o estructuración genética, los genes mitocondriales son preferibles a los marcadores nucleares (Taylor *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2014). Además, el análisis del genoma mitocondrial sugiere que las subpoblaciones de *P. vivax* de América son el resultado de migraciones múltiples (Taylor *et al.*, 2013).

En este estudio, para obtener conocimiento de cómo las variantes antigénicas se presentan con el tiempo, se analizaron los polimorfismos en *Pvdbp*<sub>II</sub> y los cambios en las frecuencias de haplotipos, resaltando los polimorfismos en los residuos 417, 437 y 503 en una muestra de *P. vivax* del Sur de México durante el periodo 1993-2011. Para definir si los distintos haplotipos de *Pvdbp*<sub>II</sub> corresponden a una única población, se determinaron las subpoblaciones genéticas basadas en un fragmento del Citocromo b.

## II. Materiales y Métodos

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas de pacientes infectados con *P. vivax* que acudieron al laboratorio de inmunoparasitología del Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP-INSP) en Tapachula Chiapas, México durante el periodo 1993-2011 (González-Cerón *et al.*, 1998, 2000, 2007, 2010, 2013; Cerritos *et al.*, 2014). Para este estudio se incluyeron grupos de muestras seleccionadas al azar de cada periodo de tiempo; 1993-1995, 2000-2002, 2006-2007 y 2010-2011 del banco de muestras que se resguarda en el CRISP/INSP. Las muestras correspondientes a los años 1993-1995, 2000-2001, 2010-2011 fueron preservadas en papel filtro. Mientras que las muestras correspondientes a los años 2002, 2006-2007 se preservaron como sangre completa en congelación; las secuencias del periodo 2006-2007 fueron previamente obtenidas (Corzo-Mancilla, 2013; Tesis de Maestría/CRISP-INSP). El anexo 1 muestra los casos de paludismo en el estado de Chiapas y la Jurisdicción VII del estado.

### 2.1. Amplificación de los fragmentos de genes de la Proteína de unión al antígeno Duffy dominio II (*PvdbpII*) y del Citocromo b (*Pvcitb*)

La extracción de ADN de las muestras sanguíneas se realizó utilizando un kit comercial Qiagen Qiamp blood Minikit (Qiagen CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante: de la sangre preservada en papel filtro preservado seco y cubierto de la luz, se cortaron seis círculos de 0.5cm de diámetro y se obtuvo un volumen final de 100µl de ADN, mientras que de 100 µl de sangre completa preservada a -70°C se descongeló, procesó y se obtuvieron 200µl de ADN. El ADN en agua se guardó a -20°C hasta su uso.

El fragmento de aproximadamente 900 pb del gen *PvdbpII* fue amplificado por PCR anidada utilizando dos pares de iniciadores (Tomasini, 2014; tesis de Licenciatura CRISP-INSP):

- DBPF1: GATAAACTGGGGAGGAAAAAGAT
- DBPR1: CTTATCGGATTTGAATTGGTGGC
- DBPF3: CCTCGAATGGTGGCAATCCT
- DBPR3: CCTCTTCAACGGAACAAACGCA

Se estandarizó la reacción según las siguientes condiciones. La mezcla de reacción del PCR1 se preparó a un volumen final de 20µL con 1.0µL de ADN, 1.0µL de la mezcla de oligonucleótidos (1.25mM), 1.0µL de cada iniciador (10pM), 1.6µL de MgSO<sub>4</sub> (25mM), 4.0µL de buffer 10X, 0.2µL de GoTaq DNA polimerasa (5unit/µL) y 10.2µL de agua grado biología molecular. El PCR2 se preparó a un volumen final de 50µL con 2.5µL de ADN, 2.5µL de la mezcla de oligonucleótidos (1.25mM), 2.5µL de cada iniciador (10pM), 4.0µL de MgSO<sub>4</sub> (25mM), 10.0µL de buffer 10X, 0.5µL de GoTaq DNA polimerasa (5unit/µL) y 25.5µL de agua. La amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones (mismas condiciones para PCR1 y PCR2): 95°C por 3 min, seguido por 35 ciclos de 95°C por 45 sec, 57°C por 1 min, 72°C por 1.30 min, con un ciclo de extensión final de 72°C por 5 min, en un termociclador MyCycler (BioRad Hercules CA, USA).

Para diseñar los iniciadores para citocromo B, se emplearon las secuencias respectivas obtenidas del GenBank (AY598035.1- AY598140.1 Jongwutiwes *et al.*, 2005) las cuales se alinearon con el algoritmo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) con el software BioEdit v7.2.5. Se identificaron sitios conservados adyacentes a los polimorfismos dentro de un fragmento de 1000 pb aproximadamente. Los iniciadores fueron los siguientes:

- CITBF1: TCCTACATTTGCTGGAGATCCT
- CITBR1: CACCATCCACTCCATAATTCTC

Se estandarizó la reacción según las siguientes condiciones. La mezcla de reacción del PCR se preparó a un volumen final de 50µL con 3.0µL de ADN, 2.50µL de la mezcla de oligonucleótidos (1.25mM), 2.0µL de cada iniciador (10pM), 4.0µL de MgSO<sub>4</sub> (25mM), 10.0µL de buffer 10X, 0.5µL de GoTaq DNA polimerasa (5unit/µL) y 26.0µL de agua. La amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 95°C por 3 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 40 sec, 56°C por 30 sec, 72°C por 1 min, con un ciclo de extensión final de 72°C por 5 min.

Tres microlitros del producto amplificado de los genes *PvdbpII* y *Pvcitb* se corrieron por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio, posteriormente se visualizaron en un transluminador con luz ultravioleta (UV) en un equipo con foto-documentación Enduro™ GDs (Labnet international, Inc.).

### 2.1.2. Purificación y secuenciación

Los productos amplificados por PCR 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 enviaron a secuenciar en ambos sentidos con los mismos iniciadores utilizados en el PCR usando el método de Sanger, a la Unidad High Throughput Genomics, Department of Genome Sciences, Universidad de Washington, Seattle, USA.

### 2.1.3. Revisión y análisis de datos

Se revisó la calidad de las secuencias obtenidas para cada gen, de forma manual y con el programa BioEdit v7.2.5. Con las secuencias en sentido y anti-sentido se obtuvieron las secuencias consenso. Además, para realizar los análisis genéticos (STRUCTURE y  $F_{ST}$ ) se extrajeron secuencias de ADN disponibles en el GenBank: de los mismos genes y de otros sitios geográficos:

*Para PvdbpII*: Colombia; COL (n=18: U50575-U50590), Papua Nueva Guinea; PNG (n=7: AF289635, AF289640, AF289642, AF289653, AF289680, AF289683, AF291096); Tailandia, (n=23: EF219451, EF368159-EF368180, EF379127, EF379134), Myanmar; MYN (n=54: JN255576-JN255587), India; IND (n= 93: FJ491142-FJ491144, FJ491146-FJ491161, FJ491163-FJ491169, FJ491171-FJ491173, FJ491175-FJ491218, FJ491221-FJ491234, FJ491236-FJ491241), Corea del Sur; SK(n=12: JN989472-JN989483), Irán; IRN (n=14: KF791921, KF791923-KF791926, EU860430-EU86038), Uganda; UGN (n=7: JX174522-JX174528).

*Para Pvcitb*: África n=17: AY791517- AY791528, JN788737, JN788764-JN788765, AY791692 (Mu *et al.*, 2005; Culleton *et al.*, 2011); Cambodia n=19: KC330514-KC330532 (Taylor *et al.*, 2013); Madagascar n=26: JN788738- JN788763 (Culleton *et al.*, 2011); Brasil n=61: AY791529- AY791540, AY791574- AY791597, KF668430-KF668436, KC330597- KC330614 (Mu *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2014); Venezuela n=15: KC330664- KC330678 (Taylor *et al.*, 2013); Perú n=17:

KC330633- KC330649 (Taylor *et al.*, 2013); Colombia n=17: KC330370- KC330385, AY791547 (Mu *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2013); Nicaragua n=1: AY791541 (Mu *et al.*, 2005); Panamá n=10 AY791542, AY791548- AY791550, KF668437- KF668442 (Mu *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2014); El Salvador n=3: AY791543, AY791551, NC\_007243 (Mu *et al.*, 2005; Jongwutiwes *et al.*, 2005); República Dominicana n=1 AY791544 (Mu *et al.*, 2005); Honduras n=2: AY791545- AY791546 (Mu *et al.*, 2005); Irán n=2: AY791625- AY791626 (Mu *et al.*, 2005); Pakistán n=36, AY791627, AY791629, KC330406- KC330439 (Mu *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2013); Turquía n=26: KC330481- KC330496, JN788767- JN788776 (Taylor *et al.*, 2013; Culleton *et al.*, 2011); Indonesia n=22: AY791552, AY791553, AY791563, AY791567, AY791572, AY791576- AY791580, AY791582, AY598098. AY598108 (Mu *et al.*, 2005; Jongwutiwes *et al.*, 2005); Asia n=3: AY791553, AY791555, AY791573 (Mu *et al.*, 2005); Corea del Norte n=1: AY791554 (Mu *et al.*, 2005); Sri Lanka n=2: AY791557, AY791575 (Mu *et al.*, 2005); Tailandia n=44: AY791556, AY791558- AY791560, AY791583, AY598035- AY598073 (Mu *et al.*, 2005; Jongwutiwes *et al.*, 2005); Vanuatu n=7: AY791561, AY791565- AY791570, AY791574 (Mu *et al.*, 2005); Islas Salomón n=4: AY598116- AY598118, AY791564 (Mu *et al.*, 2005; Jongwutiwes *et al.*, 2005); Vietnam n=9: AY598121- AY598127, AY791581, AY791584 (Mu *et al.*, 2005; Jongwutiwes *et al.*, 2005), Filipinas n=1: AY791571 (Mu *et al.*, 2005); China n=35: AY791585- AY791606, AY598128- AY598140 (Mu *et al.*, 2005; Jongwutiwes *et al.*, 2005); India n=20: AY791607- AY791622, AY791624, AY791628, AY791630, AY598120 (Mu *et al.*, 2005; Jongwutiwes *et al.*, 2005); Bangladesh (n=9: AY791631- AY598115 (Mu *et al.*, 2005); Papúa Nueva Guinea n=61 AY791631- AY791690, AY598119 (Mu *et al.*, 2005; Jongwutiwes *et al.*, 2005); Corea del Sur n=36: AB550270- AB550279, AB550280, KC330533- KC330557 (Iwagami *et al.*, 2010; Taylor *et al.*, 2013), Estados Unidos (casos importados) n=69: KF668361- KF668429 (Rodrigues *et al.*, 2014).

#### **2.1.4. Análisis genético de *PvdbpII***

Las secuencias consenso *PvdbpII* se alinearon con las secuencias de las cepas Sal 1 (XM\_001608337.1) y Belem (EU395587.1). Los haplotipos se ordenaron de acuerdo a su frecuencia (dh1, el más frecuente hasta dh11, el menos frecuente). Se elaboró una tabla de

polimorfismos, la frecuencia de los haplotipos para cada periodo de tiempo, y cambios en la frecuencia de las variantes para los residuos 417-437-503.

Considerando que en la zona de estudio, la reducción de la transmisión ha sido gradual y asumiendo que tal reducción podría afectar la diversidad genética, se calcularon los índices de diversidad para las secuencias totales ( $n=102$ ; 1993-2011) y para cada periodo de tiempo:  $\pi$  (**Pi**) =  $(\pi=2\sum diji<j/(n(n-1))$  es el promedio de sustituciones de nucleótidos por sitio entre dos secuencias (Nei y Li, 1979); y  $\theta$  (**theta**) =  $K/a$ , donde **K** es el número de sitios segregativos en una muestra de secuencias dada y  $a=1+1/2+\dots+1/n-1$ , donde **n** es el número de secuencias en la muestra (Watterson, 1975). Además, se determinó el número de sitios de polimórficos (S), número de haplotipos (h) y diversidad haplotípica (Hd). También se determinó el número mínimo de eventos de recombinación ( $R_m$ ), los valores de recombinación por gen, y en sitios adyacentes utilizando el software DnaSP v5.10.01 (Librado & Rozas, 2010).

### **2.1.5a. Análisis de estructura genética para definir grupos o subpoblaciones basado en los fragmentos *PvdbpII* y *Pvcitb* en la muestra del Sur de México**

Para mostrar no sólo las variaciones en las frecuencias de haplotipos a lo largo del tiempo sino posibles variaciones en grupos genéticos, se usó el método de agrupamiento basado en un modelo bayesiano e implementado en STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). El número más probable de grupos genéticos o subpoblaciones ( $K$ ) en la muestra total se determinó mediante la probabilidad de ancestría de cada haplotipo. Los parámetros del modelo fueron mezclados con las frecuencias alélicas correlacionadas. Se realizaron 20 repeticiones para cada  $K$  evaluada (1-8), cada uno con 100,000 interacciones y 50000 “burn-in”. El valor probabilístico de  $K$  se obtuvo a través del cálculo de  $\Delta K$  para cada  $k=2-8$  mediante la prueba de Evanno utilizando el software Structure Harvester web v0.6.94 (Evanno *et al.*, 2005). Para determinar la dinámica temporal de los grupos genéticos identificados, los aislados se ordenaron de acuerdo a la fecha de obtención de la muestra del paciente.

Sin embargo, los grupos genéticos obtenidos basados en el segmento *PvdbpII* podrían estar sesgados porque este gen está sometido a una presión de selección inmunológica. Por ello y

asumiendo que la mayoría de los polimorfismos genéticos de los marcadores mitocondriales son evolutivamente “neutrales” y pueden reflejar la historia poblacional de los linajes (Rodrigues *et al.*, 2014), se hizo el análisis de estructura usando un fragmento del *Pvcitb* para determinar los grupos genéticos de *P. vivax* en la muestra.

### **2.1.5b. Diferenciación genética ( $F_{ST}$ )**

Para determinar la diferenciación temporal y geográfica de *P. vivax* en la muestra del Sur de México se determinaron los valores de  $F_{ST}$ . Este método realiza comparaciones pareadas entre los sitios polimórficos mediante el modelo de Kimura 2 parámetros con el software DnaSP v5.10.01 (Librado & Rozas, 2010). Primero, basado en *PvdbpII* se determinaron posibles cambios de este índice entre grupos de parásitos de distinto periodo de tiempo, suponiendo que a mayor intervalo de tiempo hay más probabilidad de que las poblaciones se diferencien. La diferenciación entre *P. vivax* en la muestra y otros sitios geográficos se realizó con ambos marcadores *PvdbpII* y *Pvcitb*.

### **2.2. Red de haplotipos para *PvdbpII* del Sur de México**

Finalmente, se analizó la correspondencia de los grupos genéticos de *PvdbpII* definidos por el programa structure y su relación dada por la distribución en la red de haplotipos. Se preparó una red de haplotipos, donde las relaciones genéticas pueden ser inferidas a través de pasos mutacionales, haciendo posible reconocer procesos como diversificación. Para elaborar la red de haplotipos se utilizó el software TCS v1.21 el cual emplea predicciones derivadas de la teoría de coalescencia (Clement *et al.*, 2000) y el software popART v1.7.

### **2.3. Relación entre los grupos genéticos determinados con los haplotipos *PvdbpII* y las variantes para los residuos 417-437-503.**

Se determinó la presencia y frecuencia de los haplotipos y las variantes para los residuos 417-437-503 de *PvdbpII* para cada uno de los grupos genéticos determinados con el programa structure y/o agrupados en la red de haplotipos. También se prepararon mapas con la ubicación geográfica de los haplotipos de *PvdbpII* para cada periodo de tiempo.

### III. Resultados

#### 3.1.1. Polimorfismo genético y distribución temporal de los haplotipos de *PvdbpII*

Se obtuvo la secuencia consenso del fragmento *PvdbpII* que comprende los nucleótidos 592 - 1491 (aminoácido 198-497) según la cepa de referencia Sal I. Se obtuvieron 102 secuencias consenso; 25 del periodo 1993 - 1995, 20 del periodo 2000 - 2001, 35 secuencias del 2006 - 2007 y 22 del periodo 2010 - 2011 (tabla 1).

Número de muestras procesadas y amplificadas por PCR para el fragmento del gen *PvdbpII*

Periodo (años)	Muestras procesadas	Muestras amplificadas			Se obtuvo la secuencia consenso
		1er intento	2do intento	TOTAL	
1993-1995	28	27	0	27	25
2000-2002	40	32	4	36	20
2010-2011	31	29	1	30	22

De algunas muestras que amplificaron no se obtuvo el consenso debido a la poca cantidad de producto de PCR

En este fragmento se encontraron 12 sitios polimórficos, de los cuales 11 fueron no sinónimos y uno sinónimo. Se resolvieron 11 haplotipos (dh1-dh11), siendo el dh1 y dh2 los más frecuentes y cuatro haplotipos fueron únicos. El haplotipo dh4 fue idéntico a la cepa de referencia (Sal 1) detectado en 5 aislados. Varios polimorfismos encontrados en las secuencias de aislados del Sur de México habían sido reportados en la secuencia de la cepa Belem, aunque ningún haplotipo fue idéntico a esta secuencia (Tabla 2).

Distribución temporal de los haplotipos *PvdbpII*. De los 11 haplotipos encontrados en la muestra, solo dh1 y dh2 se detectaron en todos los periodos de tiempo. Los haplotipos, dh3 y dh4 se detectaron los periodos 1993-1995 y 2000-2002, para el 2006-2007 se detectó el mayor número de haplotipos, y en 2010-2011 sólo el dh1 y dh2 fueron detectados (Figura 1A).

Con respecto a los residuos 417, 437, 503, se detectaron cuatro combinaciones (VanBuskirk *et al.*, 2004; Anexo 2); el tipo Sal 1 NWI en los haplotipos dh3, dh4, dh6 y dh7 y su frecuencia fue disminuyendo con el tiempo y no se detectaron en el periodo 2010-2011; la variante NWK en un haplotipo dh5 se detectó en 2000-2002 y 2006-2007, mientras KWK se detectó en un haplotipo único (dh10) en el 2006-2007. Pero la variante KRK fue la más frecuente, se encontró en los haplotipos dh1, dh2, dh8, dh9, dh11 y su

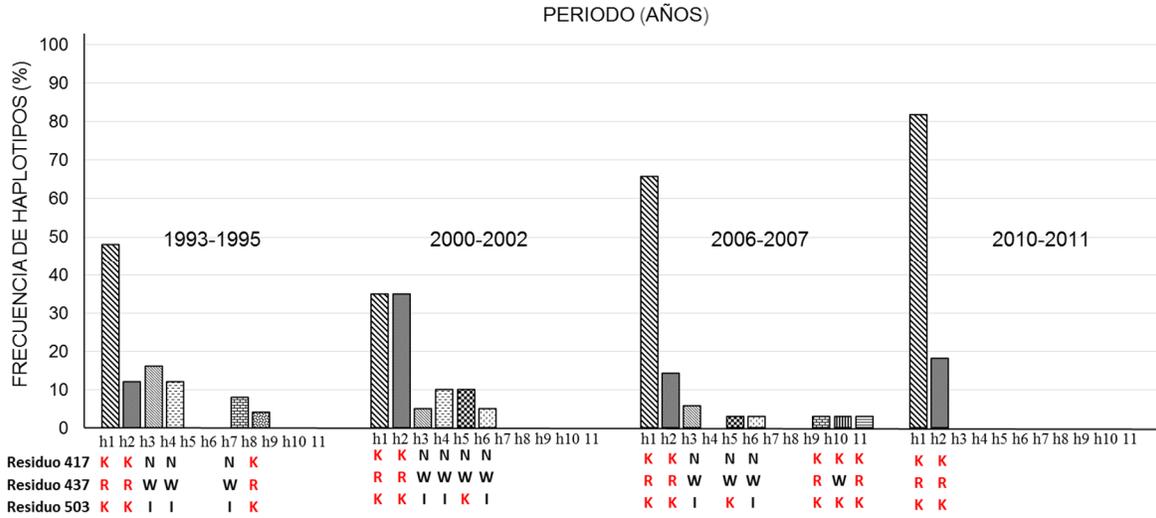
frecuencia se incrementó con el tiempo, en el 2010-2011 todas las secuencias tenían KRK (Figura 1B).

**Tabla 2.** Polimorfismo de nucleótidos y amino ácidos del gen *PvDBP<sub>II</sub>* en parásitos del Sur de México.

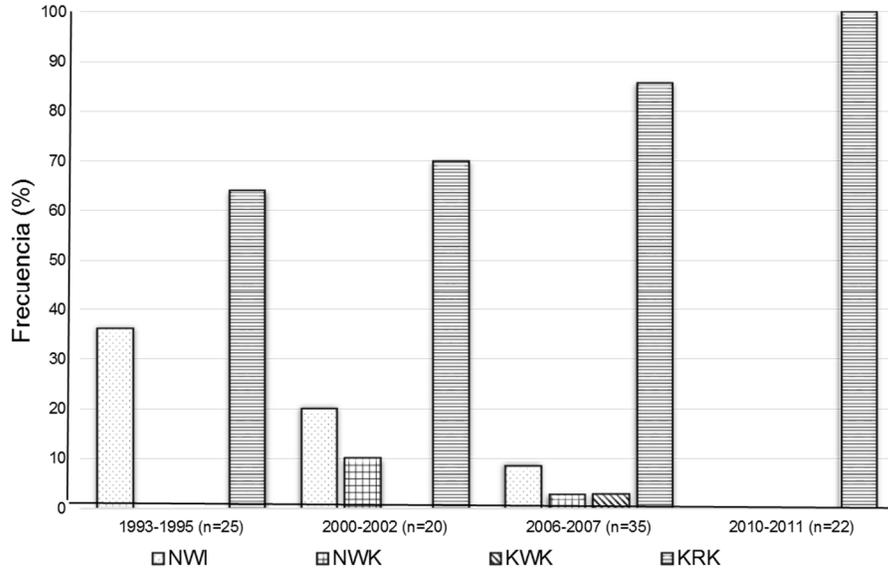
	<sup>R</sup> posición del codón	308	371	384	385	386	390	<b>417</b>	424	<b>437</b>	489	490	497	499	501	<b>503</b>	529	531	
	<sup>R</sup> nucleótidos	agg	aaa	gat	Gaa	aag	cgt	<b>Aat</b>	Tta	<b>tgg</b>	acc	aga	gtt	tca	aaa	<b>ata</b>	gaa	aac	
	<sup>R</sup> amino ácido	Arg	Lys	Asp	Gly	Lys	Arg	Asn	Leu	Trp	Thr	Arg	Val	Ser	Lys	Ile	Glu	Asn	
	Cambio de aa	Ser	Glu	Gly	Glu	Asn	His	Lys	Ile	Arg	Ser	Thr	Ala	Lys	Gly	Lys	Lys	-	
<b>haplotipo</b>	<b>N</b>																		
<b>dh1</b>	60	...	...	...	...	...	...	<b>..a</b>	a..	<b>c..</b>	...	...	...	...	...	<b>.a.</b>	...	...	...
<b>dh2</b>	19	..t	g..	.g.	a..	..t	...	<b>..a</b>	a..	<b>c..</b>	...	...	...	...	...	<b>.a.</b>	...	...	...
<b>dh3</b>	7	...	...	.g.	...	...	.a.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	a..	..T	...
<b>dh4</b>	5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<b>dh5</b>	3	...	...	.g.	...	...	.a.	...	...	...	...	...	...	...	...	<b>.a.</b>	...	...	...
<b>dh6</b>	2	...	...	.g.	...	...	.a.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
<b>dh7</b>	2	...	g..	.g.	...	...	.a.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	a..	..T
<b>dh8</b>	1	...	g..	.g.	...	...	...	<b>..a</b>	a..	<b>c..</b>	...	...	...	...	...	<b>.a.</b>	...	...	...
<b>dh9</b>	1	..t	g..	...	...	...	...	<b>..a</b>	a..	<b>c..</b>	...	...	...	...	...	<b>.a.</b>	...	...	...
<b>dh10</b>	1	...	...	.g.	...	...	...	<b>..a</b>	a..	...	...	...	...	...	...	<b>.a.</b>	...	...	...
<b>dh11</b>	1	...	g..	.g.	a..	..t	...	<b>..a</b>	a..	<b>c..</b>	...	...	...	...	...	<b>.a.</b>	...	...	...
<b>Cepa Belem</b>		..t	g..	.g.	a..	..t	...	<b>..a</b>	a..	<b>c..</b>	.g.	.c.	.cg	aa.	gg.	<b>.a.</b>	...	...	...

<sup>R</sup> cepa de referencia: Salvador 1 (XM\_001608337.1)

Los cambios mostrados en mayúsculas corresponden a mutaciones de tipo sinónimas y los cambios mostrados en minúsculas a mutaciones de tipo no sinónimas. Se muestran los polimorfismos utilizando como referencia a la cepa Sal 1, al final se muestra la secuencia correspondiente a la cepa Belem; EU395587. Los haplotipos se ordenaron de acuerdo a su frecuencia. De acuerdo a la cepa Sal 1, el fragmento analizado comprende del codón 198-497 (correspondiente a los pares de bases 592 a 1491). Los aminoácidos son indicados en código de tres letras; aa; amino ácido



**Figura 1A. Fluctuaciones en las frecuencias de haplotipos de *PvdbpII* durante 1993-2011 en parásitos del Sur de México.** Once haplotipos ordenados por su frecuencia dh1→dh11. Los haplotipos dh1 y dh2 se detectaron en todos los tiempos analizados, mientras otros haplotipos fueron menos frecuentes. Se indican los polimorfismos en los residuos 417,437 y 503; K: Lisina; R: Arginina; N: Asparagina; W: Triptófano; I: Isoleucina.



**Figura 1B. Cambio en las frecuencias de las variantes del gen *PvdbpII* dadas por los residuos 417-437-503 en distintos periodos de tiempo en el Sur de México.** NWI (Ile-Tri-Ile), NWK (Asn-Tri-Lys), KWK (Lys-Tri-Lys), KRK (Lys- Arg-Lys).

También se encontraron otros polimorfismos asociados a las variantes de los residuos 417-437-503; para la variante NWI se asociaron los polimorfismos 390E, 517K y con la variante KKK se presentaron los polimorfismos 170E, 385E y 386N. En el anexo 3 se muestra las frecuencias de los polimorfismos en los distintos periodos de tiempo; la variante NWI y los polimorfismos asociados a fueron disminuyendo en el tiempo, mientras la variante KKK y algunos polimorfismos asociados incrementaron su frecuencia con el tiempo (Figura 1B y Anexo 3).

Se encontró un decremento constante en los índices de diversidad, valores de Tajima's D y recombinación con respecto al periodo de tiempo (Tabla 3). En los periodos 1993-1995 y 2000-2002 los índices de diversidad genética fueron similares. Para 2006-2007, los índices de diversidad disminuyeron, pero para los años 2010-2011 tal disminución fue mucho más significativa. El valor Rm fue igual para los tres primeros periodos (valor igual a 1), sin embargo, para el periodo 2010-2011 el valor fue de cero.

**Tabla 3.** Índices de diversidad genética de *PvDBP<sub>II</sub>*: variaciones por periodo de tiempo.

Parámetros:	TOTAL	Por periodo de tiempo			
		1993-1995	2000-2002	2006-2007	2010-2011
<b>N</b>	102	25	20	35	22
<b>M</b>	12	12	12	12	5
<b>Π</b>	0.004	0.005	0.005	0.003	0.001
<b>θ<sub>w</sub></b>	0.002	0.004	0.004	0.003	0.001
<b>H</b>	11	6	6	8	2
<b>Hd</b>	0.616	0.736	0.768	0.556	0.133
<b>Tajima's D</b>	1.414	1.520	1.331	-0.003	0.404
<b>Rm</b>	2	1	1	1	0

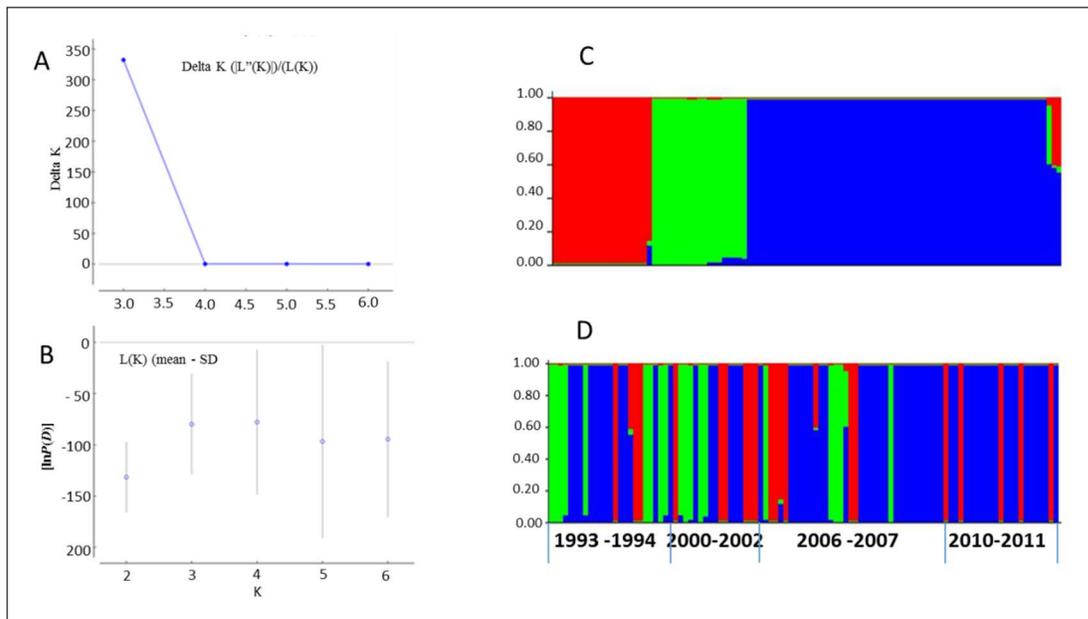
N: número de aislados; M: Sitios segregativos; h: número de Haplotipos; Hd: Diversidad haplotípica;  $\pi$ :  $\Pi$ ;  $\theta_w$ ; teta; D: Prueba de Tajima; Rg, Parámetro de recombinación por gen; SR parámetro de recombinación entre sitios adyacentes; Rm: eventos de recombinación.

### 3.1.2. haplotipos de *Pvdbp<sub>II</sub>* y grupos genéticos o subpoblaciones.

El programa STRUCTURE agrupó los haplotipos de *Pvdbp<sub>II</sub>* en tres subpoblaciones (figura 2). Mientras que a nivel global se detectó poca estructuración en *P. vivax* (Anexo 4). La subpoblación P1 comprendió 59% de los 102 aislados, todos tenían al haplotipo dh1, el 20% y 19% de los haplotipos se agruparon en otras dos subpoblaciones; P2: dh2, dh8, dh9, dh10 y P3: dh3, dh4, dh5, dh6, dh7, dh9, respectivamente (Figura 2C). Es interesante

observar que las subpoblaciones P1 y P2 presentaron en los residuos 417-437-503 la variante KKK y otros polimorfismos exclusivos, mientras la P3 presentó el fenotipo NWI. Similar agrupación se observó en la red de haplotipos (Anexo 5).

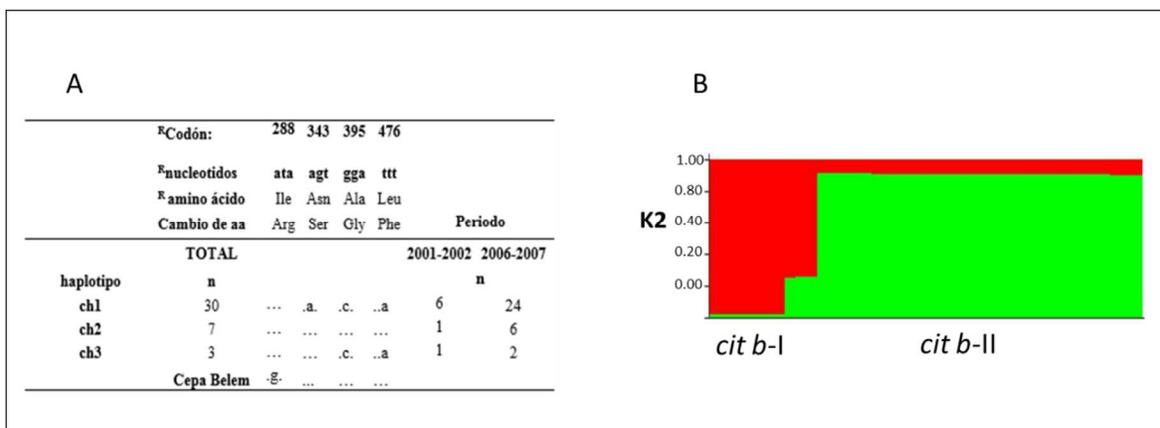
La Figura 2D muestra los haplotipos ordenados cronológicamente, el color indica la subpoblación a la cual fueron asignados (P1, P2 y P3). Se observaron cambios en la presencia de cada subpoblación a lo largo del tiempo; la subpoblación P1 fue la más frecuente y se observa en todos los periodos de tiempo analizados; desde 1993 y hasta el 2011, muy similar a la subpoblación P2, aunque esta última en menor frecuencia. Sin embargo, la subpoblación P3 se detectó desde 1993 y hasta 2007, pero no se detectó en las muestras analizadas del 2010-2011.



**Figura 2.** Subpoblaciones de *P. vivax* en parásitos del Sur de México basado en el fragmento *PvdbpII*, 1993-2011. A) Gráfica de probabilidad logarítmica de Delta K, sugiere la resolución de 3 subpoblaciones como lo más probable para este grupo de secuencias ( $K=3$ ). B) Gráfica de la probabilidad logarítmica  $[\ln P(D)]$  de los datos para  $K=1-6$ . C) subpoblaciones de *P. vivax* (cada barra corresponde a un aislado y cada subpoblación se indica con color distinto. D) Se muestra el orden cronológico de las subpoblaciones genéticas identificadas; 102 aislados (cada barra corresponde a un aislado y cada subpoblación con distinto color. la subpoblación más frecuente (P1 *dbpII*; azul) se detectó en los distintos tiempos, similar pero en menor frecuencia la subpoblación P2 *dbpII* /roja, mientras parásitos de la población P3 *dbpII* /verde no se detectaron en 2010-2011.

### 3.2. Agrupamiento de las variantes del gen *PvdbpII* en los grupos genéticos definidos por el mismo marcador y por el gen *Pvcitb*

El fragmento amplificado del gen *Citocromo b* se obtuvo para 40 aislados, de tamaño aproximado de 875pb y coordenadas 745 -1619 (aminoácidos 249-540), sólo se logró obtener de las muestras de ADN extraído de sangre completa: ocho aislados del periodo 2001-2002 y 32 del periodo 2006-2007. Se identificaron únicamente tres haplotipos y estos se agruparon en dos subpoblaciones de *P. vivax* (Figura 4). Comparando con K=3 también se distinguen dos subpoblaciones, aunque la mayoritaria parece ser mezclada (Anexo 6).



**Figura 4.** Polimorfismos del gen *Pvcitb* y su agrupación en subpoblaciones de *P. vivax* del Sur de México

A) Frecuencia de los polimorfismos de nucleótido y amino ácido del gen *Pvcitb*.

B) subpoblaciones genéticas de *P. vivax*. Se usaron las secuencias de 40 aislados del 2000-2007 (cada barra corresponde a un aislado y cada subpoblación corresponde a color distinto).

La subpoblación *cit b-I* correspondió a los grupos genéticos de *PvdbpII* P1 y P2, aquí se identificaron cuatro haplotipos; el dh1 fue el más frecuente (72%), seguido del dh2 (21.21%) y los dh10 y dh11; todos presentaron la variante KKK. Mientras, la subpoblación *cit b-II* comprendió el grupo genético de *PvdbpII* P3 se identificaron otros cuatro haplotipos *PvdbpII* y un aislado con el haplotipo dh1 en esta predominó el fenotipo NWI (Tabla 4). En general y a pesar de lo limitado de la muestra analizada para *Pvcitb* hubo correspondencia entre los dos grupos genéticos y las variantes *PvdbpII* NWI contra KKK. La variante NWI se detectó principalmente entre la ciudad de Tapachula y la zona costera mientras la variante KKK entre la ciudad de Tapachula y las faldas de colinas (Figura 4).

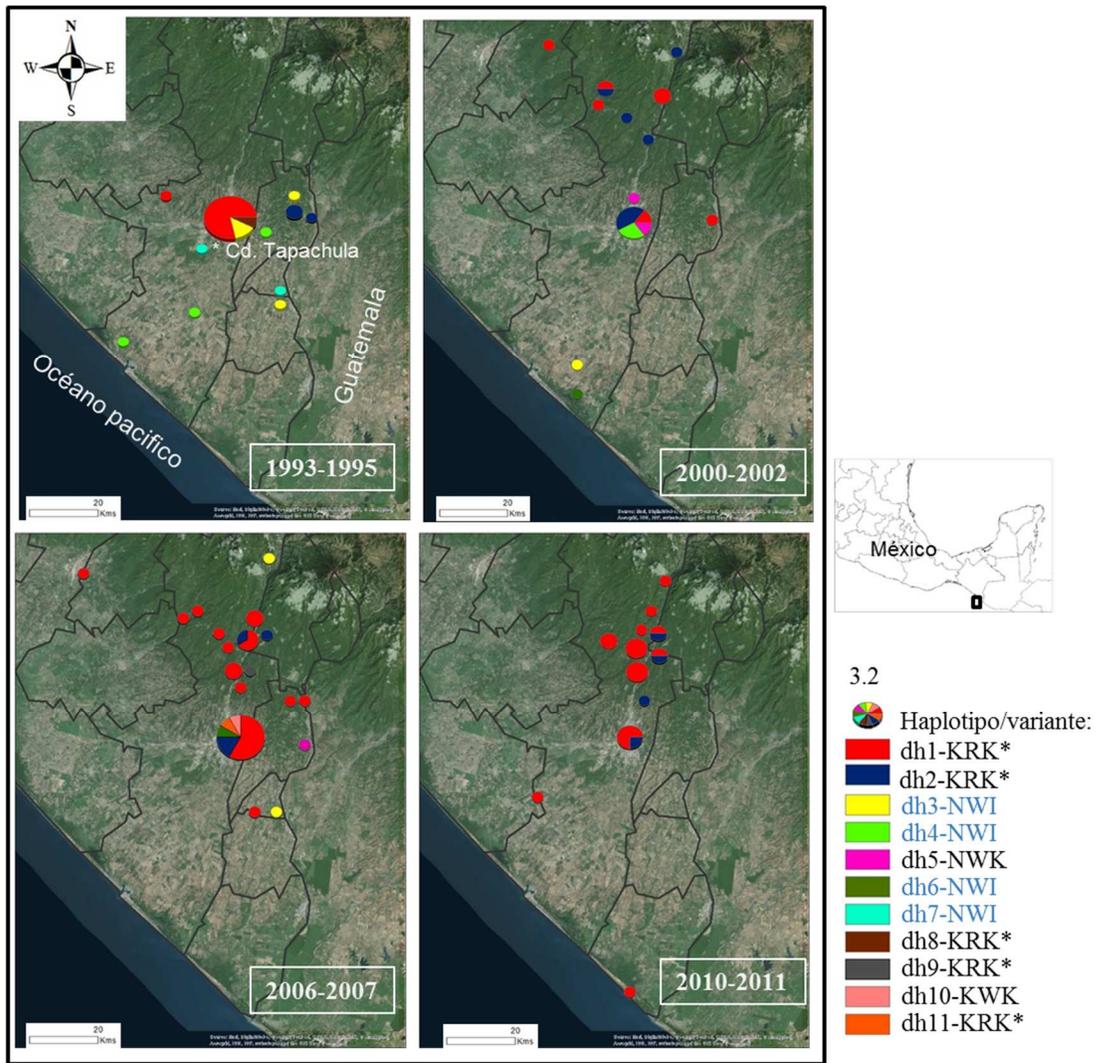
**Tabla 4.** Frecuencias de haplotipos de *Pvdbp<sub>II</sub>* en las subpoblaciones descritas por el marcador *Pvcitb* en parásitos del Sur de México.

haplotipo <i>Pvdbp<sub>II</sub></i>	n (Subpoblación 1 <i>cit b</i> )	Frecuencia (%)	n (Subpoblación 2 <i>cit b</i> )	Frecuencia (%)
	<b>h1<sup>VIII</sup></b>	<b>24</b>	<b>72.72</b>	<b>1</b>
<b>h2<sup>VIII</sup></b>	<b>7</b>	<b>21.21</b>	-	-
<b>h3<sup>I</sup></b>	-	-	<b>3</b>	<b>42.85</b>
<b>h4<sup>I</sup></b>	-	-	<b>1</b>	<b>14.24</b>
<b>h5<sup>II</sup></b>	-	-	-	-
<b>h6<sup>I</sup></b>	-	-	<b>1</b>	<b>14.24</b>
<b>h7<sup>I</sup></b>	-	-	-	-
<b>h8<sup>VIII</sup></b>	-	-	-	-
<b>h9<sup>VIII</sup></b>	-	-	<b>1</b>	<b>14.24</b>
<b>h10<sup>IV</sup></b>	<b>1</b>	<b>3.03</b>	-	-
<b>h11<sup>VIII</sup></b>	<b>1</b>	<b>3.03</b>	-	-

\*Subpoblaciones del gen *Pvcitb*, ver figura 4A.

Presencia de tri-residuo; **I:** NWI; **II:** NWK, **III:** KWI; **IV:** KWK; **V:** KRI; **VI:** NRI **VII:** NRK, **VIII:** KRK

Fisher's exact test ( $\alpha=0.05$ )  $p=0.000$  para ambos grupos y considerando los residuos en las posiciones 417-437-503  $p=0.018$ .



**Figura 4.** Distribución geográfica y temporal de los haplotipos del gen *PvdbrII* y la variante detectada en los residuos 417-437-503 en parásitos del Sur de México. Para cada mapa se indica en periodo de años de la muestra.

### 3.3. Diferenciación genética de *P. vivax*

**Basado en el gen *PvdbpII*:** Los valores de  $F_{ST}$  de la comparación de los aislados de distintos años mostraron que el valor más alto de  $F_{ST}$  fue entre los años 1993-1995 y 2010-2011 (0.169), seguido de 2000-2002 contra 2010-2011 (0.127). Los valores de las otras comparaciones fueron menores de 0.060. Por otro lado, los valores de  $F_{ST}$  de *P. vivax* del Sur de México comparado con otras regiones del mundo oscilaron entre 0.174-0.31, excepto entre SMX e IRN, que obtuvo un valor de 0.0688 (Tabla 5A).

**Basado en el gen *Pvcitb*:** Los valores  $F_{ST}$  entre parásitos de México y otros sitios geográficos dentro y fuera de América fueron altos (0.475-0.799) más altos que los obtenidos con el marcador *PvdbpII*. Entre regiones de América los valores de  $F_{ST}$  fueron bajos; entre CA y BRA, CA y CO, BRA y VEN, BRA y COL, VEN y COL y de valores moderados a altos fueron entre PER y VEN, BRA y CA. Los valores entre lugares de América y fuera de América fueron altos excepto con PNG que mostró valores bajos con América excepto SMX. En otras regiones fuera de América también entre países cercanos se obtuvieron valores bajos, THA y CAM (0.088) en el sureste de Asia, Por otro lado, se observó que entre distantes regiones también muestran valores bajos: IND y MAD (0.004), PAK y MAD (0) (Tabla 5B).

**Tabla 5.** Diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) de *P. vivax* del Sur de México. (A) En base al gen *PvdbpII*: Se compararon los grupos de parásitos por periodo de tiempo y entre parásitos de las distintas regiones geográficas. (B) En base al fragmento del gen *Pvcitb*: se incluyó la muestra del Sur de México y parásitos de otros sitios geográficos.

A).

Mexico:	Total	México (años):				NIC	COL	IND	IRA	SK	MYA
		1993-1995	2000-2002	2006-2007	2010-2011						
<b>1993-1995</b>	0.0228										
<b>2000-2002</b>	0.0085	0.0202									
<b>2006-2007</b>	-0.0105	0.0529	0.0330								
<b>2010-2011</b>	0.0544	0.169	0.1274	0.0065							
<b>NIC</b>	0.1813	0.0691	0.1225	0.2352	0.3777						
<b>COL</b>	0.2993	0.2055	0.2433	0.3444	0.4476	0.1459					
<b>IND</b>	0.1941	0.1079	0.1029	0.2417	0.3725	0.0957	0.2035				
<b>IRA</b>	0.0688	0.0138	0.0368	0.1005	0.2224	0.3458	0.1957	0.0499			
<b>SK</b>	0.3109	0.2215	0.2414	0.3535	0.4894	0.2883	0.3325	0.1205	0.1861		
<b>MYA</b>	0.1748	0.1439	0.1077	0.2031	0.2953	0.1914	0.2692	0.0886	0.1169	0.1522	
<b>THL</b>	0.1699	0.1414	0.0965	0.2008	0.2893	0.1933	0.2475	0.0980	0.1371	0.1636	0.0187

B).

	MEX	CA	BRA	VEN	PER	COL	TUR	PAK	IDN	THA	CHI	IND	PNG	SK	MAD
<b>CA</b>	0.7645														
<b>BRA</b>	0.7847	0.0027													
<b>VEN</b>	0.7001	0.0184	0.0164												
<b>PER</b>	0.7328	0.2625	0.2804	0.0711											
<b>COL</b>	0.7736	0	0.0027	0.0184	0.2537										
<b>TUR</b>	0.6950	0.7938	0.8382	0.6682	0.7298	0.8135									
<b>PAK</b>	0.7272	0.8585	0.9016	0.7070	0.7704	0.8730	0.0214								
<b>IDN</b>	0.7992	0.8911	0.9134	0.7915	0.8289	0.8971	0.8178	0.8845							
<b>THA</b>	0.6376	0.1989	0.2223	0.1706	0.2755	0.2130	0.5645	0.5945	0.6832						
<b>CHI</b>	0.4753	0.5992	0.6218	0.5628	0.595	0.6140	0.4629	0.4817	0.3766	0.4608					
<b>IND</b>	0.6122	0.6290	0.6817	0.5431	0.6110	0.6613	0.6774	0.8178	0.6774	0.4511	0.3902				
<b>PNG</b>	0.6895	0.0132	0.0284	0.0283	0.2002	0.0251	0.6654	0.7082	0.7888	0.1122	0.5345	0.5265			
<b>SK</b>	0.6511	0.7220	0.7476	0.6604	0.6969	0.7360	0.5422	0.5777	0.064	0.5564	0.1814	0.4422	0.6435		
<b>MAD</b>	0.7127	0.8496	0.893	0.7018	0.7649	0.8649	0.02	0	0.8754	0.5895	0.4680	0.0042	0.7012	0.5692	
<b>CAM</b>	0.5567	0.3662	0.38	0.3203	0.3832	0.3711	0.5816	0.6024	0.6496	0.0884	0.3981	0.4925	0.2603	0.5358	0.5939

#### IV. Discusión

El estado de Chiapas, México, es uno de los estados más afectados por el paludismo y donde el número de casos se ha mantenido sobre todo en zonas fronterizas con América Central. En la jurisdicción sanitaria VII de este Estado, el número de casos ha fluctuado con el tiempo; en 1998 el fenómeno de El Niño y en el 2005 la tormenta STAN afectaron las zonas y aparentemente contribuyeron al incremento en la transmisión, aunque la cinética de casos sobre todo después del año 1999 indica una reducción gradual y constante, de hecho la reducción ha sido tan significativa que el país fue clasificado en etapa de pre-eliminación del paludismo en el 2009 (WHO, 2009). Los índices de diversidad para *PvdbpII* encontrados en este estudio fueron bajos y disminuyeron aún más con el tiempo; lo que es consistente con la gradual disminución de casos en la región. Dos haplotipos fueron persistentes en todos los periodos dh1 y dh2, el valor  $R_m$  para *PvdbpII* fue de 1 en todos los periodos, excepto en 2010-2011 fue de cero indicando la no detección de los haplotipos que muestran esta característica que no corresponden a dh1 y dh2. Aún con la poca sensibilidad de este marcador dado por la limitada variación nos permitió registrar la disminución en los índices de diversidad, pero para cambios más sutiles se requeriría marcadores más variables (Barry *et al.*, 2014).

La Proteína de Unión al Receptor Duffy de *P. vivax* (PvDBP) es un candidato importante para vacunas (Cole-Tobian *et al.*, 2003). La participación de *PvdbpII* justo al momento de la invasión podría explicar el lento desarrollo de una inmunidad adquirida natural y protectora (Barbedo *et al.*, 2007). La exposición constante es condicionante para desarrollar anticuerpos contra diferentes variantes de *PvdbpII* que circulan en una zona endémica dada (Barry *et al.*, 2014). Además, hay evidencia que indica que los polimorfismos en los residuos 417, 437 y 503 en *PvdbpII* están implicados en la evasión de anticuerpos neutralizantes (Fraser *et al.*, 1997; VanBuskirk *et al.*, 2004). Los polimorfismos que conforman los once haplotipos fueron detectados en parásitos de distintas zonas afectadas del mundo como Sudamérica, Medio oriente, Este y Sureste de Asia, Oceanía y Africa, de hecho el mayor número de variantes (n=6) se detectó en Brasil, Tailandia y Myanmar (Tomasini H., Tesis de licenciatura/CRISP-INSP).

Se detectaron cambios en las frecuencias de haplotipos de *PvdbpII*; en 102 aislados se detectaron 11 haplotipos con cuatro variantes para los residuos 417-437-503 (NWI, NWK, KWK, KRK), los haplotipos más frecuentes tenían la variante N417K (hidrófilo→ básico), W437R (hidrofóbico→ básico), I503K (hidrofóbico→ básico). NWK y KWK fueron de muy baja frecuencia y detectados sólo entre 2002-2007. Es interesante que los resultados del análisis de STRUCTURE con estas mismas secuencias sugieren que los haplotipos con el fenotipo dominante KRK corresponden a una subpoblación distinta de los haplotipos que presentaron el fenotipo Sal I; NWI. Esta agrupación de los fenotipos también se determinó con el marcador mitocondrial *Pvcitb*.

Los parásitos con fenotipo NWI se ubicaron principalmente en la Costa del Soconusco, Sur de México y un grupo con el fenotipo KRK se ubicaron al pie de montaña. Estas subpoblaciones identificadas con el marcador *PvdbpII* podrían ser similares a las descritas con el análisis de microsatélites y asociadas a la compatibilidad con los vectores locales (Joy *et al.*, 1998); ya que hay cierta coincidencia geográfica entre c1 y f1 / f2 con P3-NWI y P1-KRK / P2-KRK, respectivamente. La única diferencia entre P1 y P2 fue un dominio que P2 comparte con la cepa Belem. Los haplotipos con el fenotipo NWI fueron disminuyendo en la región a lo largo del tiempo.

En el Sur de México, *P. vivax* se transmite principalmente por dos vectores: *Anopheles albimanus* encontrado principalmente en zonas costeras y *An. pseudopunctipennis* encontrado en zonas más altas (pie de montaña) que superan los 600 msnm (Rodríguez *et al.*, 2000). En el 2010-2011 la disminución de la transmisión impactó la diversidad, sólo los haplotipos más frecuentes en años previos prevalecieron; de hecho los haplotipos que no se detectaron corresponden a una subpoblación en la zona Tapachula-Costa que está más relacionada a la cepa Sal I y posiblemente corresponden a parásitos compatibles con *An. albimanus* (González-Cerón *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2000; Joy *et al.*, 2008). La persistencia de los haplotipos con fenotipo KRK podría estar dada por diversos factores como la adaptación del parásito a vectores locales de alta transmisibilidad, parásitos capaces de producir recaídas o infecciones asintomáticas, entre otros (González -Cerón *et al.*, 2010; Joy *et al.*, 2008; Barry *et al.*, 2014).

Por último, aunque los marcadores nucleares han sido útiles para distinguir parásitos de distintas regiones, los marcadores mitocondriales pueden tener algunas ventajas sobre estos, especialmente para definir subpoblaciones, debido a algunas razones: (1) debido a que se heredan uniparentalmente, los linajes de genomas mitocondriales no se recombinan entre sí (Rodrigues *et al.*, 2014); (2) estudios en *P. falciparum* han evidenciado que los haplotipos de marcadores mitocondriales se agrupan en racimos de acuerdo al origen geográfico de las muestras (Conway *et al.*, 2000); (3) como ya se ha comentado anteriormente, los marcadores mitocondriales son evolutivamente neutrales y pueden reflejar de forma más precisa la historia poblacional de los linajes que los marcadores nucleares (Rodrigues *et al.*, 2014). La diferenciación medida por el parámetro  $F_{ST}$  usando un fragmento del *Pvcitb* fue alta y contundente, de hecho los resultados sugieren que los parásitos de SMX son distintos a los de CA y SA indicando poco flujo parasitario entre SMX y el resto de América, pero alto flujo parasitario entre CA y SA, en menor grado con zonas del Perú. También fue interesante que entre parásitos de PNG y parásitos de CA y SA tuvieron valores  $F_{ST}$  bajos mientras con otros sitios geográficos estos fueron altos. La interpretación de esto es complicada porque PNG está en un continente muy lejano y es poco probable la migración o flujo entre CA/SA y PNG que no se evidencio en el Sur de México. Aunque, otro estudio revela que los haplotipos de *PvdbpII* circulantes en PNG se distribuyen ampliamente en otras regiones del mundo, incluyendo a CA y SA (Ju *et al.*, 2012), tal vez por migraciones ancestrales, o porque éstas van evolucionando de manera similar. Cabe mencionar que la muestra analizada para *Pvcitb* fue limitada y es necesario fortalecer estos resultados ampliando la muestra en tiempo y espacio.

Usando herramientas de genética de poblaciones es posible determinar la compleja dinámica evolutiva de *P. vivax*, como las variantes se comparten, generan, persisten y dispersan. *PvdbpII* en el Sur de México es poco polimórfico, está sometido a una fuerte selección positiva como se ha demostrado en distintas zonas geográficas, probablemente debido a la respuesta inmune que ocasiona deriva antigénica en los residuos 417-437-503 (VanBuskirk *et al.*, 2004; Sousa *et al.*, 2011). En este estudio, se resolvieron dos subpoblaciones genéticas de *P. vivax* en el Sur de México basados en el gen *Pvcitb*. La subpoblación *cit b-I* se relacionó con la variante *PvdbpII* KRK, misma que predominó en el tiempo, identificada como la más persistente en la región. Pero, la disminución de la

frecuencia de NWI parece no estar relacionada con el incremento en el fenotipo KRK, los resultados sugieren que NWI y KRK corresponden a poblaciones distintas. Pero, el análisis del genoma mitocondrial podría ser útil para determinar si ambas sub-poblaciones *PvdbpII* se han diferenciado en la región o corresponden a migraciones distintas que fueron evolucionando paralelamente, por su ubicación geográfica y compatibilidad vectorial (Joy *et al.*, 2008; González-Cerón *et al.*, 2010). Entonces la presencia de las variantes en los residuos 417-437-503 podría no corresponder al efecto de la deriva antigénica, aunque a partir de estos resultados es muy difícil llegar a una conclusión; tendríamos que poder explorar en las poblaciones humanas afectadas la alternancia de anticuerpos y fenotipos de las posiciones variantes 417-437-503.

Finalmente, nuestros resultados indican que los parásitos del Sur de México son una población genéticamente bien diferenciada, lo que sugiere un limitado flujo genético de *P. vivax* para el Sur de México podría ser ventajoso para el avance en la eliminación del paludismo en la región.

## **Bibliografía**

Arnott, A., Barry, A.E. & Reeder, J. C. Understanding the population genetics of *Plasmodium vivax* is essential for malaria control and elimination. *Malaria Journal* 2012; 1–10.

Barbedo MB, Ricci R, Jimenez MC, Cunha MG, Yazdani SS, Chitnis CE, Rodrigues MM, Soares IS. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102(3):335-9.

Barry AE, Arnott A. Strategies for designing and monitoring malaria vaccines targeting diverse antigens. *Front Immunol* 2014; 5:359.

Cerritos R, González-Cerón L, Nettel JA, Wegier A. Genetic structure of *Plasmodium vivax* using the merozoite surface protein 1 icb5-6 fragment reveals new hybrid haplotypes in southern Mexico. *Malar J*. 2014 Jan 29; 13:35.

Chootong P1, Ntumngia FB, VanBuskirk KM, Xainli J, Cole-Tobian JL, Campbell CO, Fraser TS, King CL, Adams JH. Mapping epitopes of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein with naturally acquired inhibitory antibodies. *Infect Immun*. 2010; 78(3):1089-95

Cole-Tobian J, King CL. Diversity and natural selection in *Plasmodium vivax* Duffy binding protein gene. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 127:121-32.

Cole-Tobian JL, Michon P, Dabod E, Mueller I, Rey CL. Dynamics of asymptomatic *Plasmodium vivax* infections and Duffy binding protein polymorphisms in relation to parasitemia levels in Papua New Guinean children. *Am J Trop Med Hyg*. 2007; 77(5):955-62.

Corzo-Mancilla J. Diversidad genética y antigénica de moléculas candidatos para vacunas (dbpII, amaI-II y msp1) del merozoíto de *Plasmodium vivax* del sur de México. Tesis de Maestría CRISP-INSP 2013.

Conway DJ, Fanello C, Lloyd JM, Al-Joubori BM, Baloch AH, Somanath SD, Roper C, Oduola AM, Mulder B, Pova MM, Singh B, Thomas AW. Origin of *Plasmodium falciparum* malaria is traced by mitochondrial DNA. *Mol Biochem Parasitol*. 2000; 111:163–171.

Dean L. Blood Groups and Red Cell Antigens, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, 2005.

Evano, 2005. Structure Harvester.

Fraser T, Michon P, Barnwell JW, et al. Expression and serologic activity of a soluble recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infect Immun* 1997; 65:2772-7.

Gonzalez-Ceron L1, Rodriguez MH, Santillan FV, Hernandez JE, Wirtz RA. Susceptibility of three laboratory strains of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) to coindigenous *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein phenotypes in southern Mexico. *J Med Entomol.* 2000; 37(3):331-4.

González-Cerón L, Rodríguez MH, Betanzos AF, Abadía A. Efficacy of a rapid test to diagnose *Plasmodium vivax* in symptomatic patients of Chiapas, Mexico. *Salud Publica Mex.* 2005; 47(4):282-7.

González-Cerón L, Alvarado-Delgado A, Martínez-Barnetche J, Rodríguez MH, Ovilla-Muñoz M, Pérez F, Hernandez-Avila JE, Sandoval MA, Rodríguez Mdel C, Villarreal-Treviño C. Sequence variation of ookinete surface proteins Pvs25 and Pvs28 of *Plasmodium vivax* isolates from Southern Mexico and their association to local anophelines infectivity. *Infect Genet Evol.* 2010; 10(5):645-54.

González-Cerón L, Legorreta-Herrera M: Malaria: Current actors for treatment In *Current Topics of Drug Desing in Parasitic and Bacterial Diseases*. Edited by Tellez VA, Pedraza RM. Kerala, India: Transworld Research Network 2012:1-25.

Gonzalez-Ceron, Mu J, Santillán F, Joy D, Sandoval MA, Camas G, Su X, Choy EV, Torreblanca R. Molecular and epidemiological characterization of *Plasmodium vivax* recurrent infections in southern Mexico. *Parasit. Vectors* 2013; 18: (6).

González-Cerón L, Martinez-Barnetche J, Montero-Solís C, Santillán F, Soto AM, Rodríguez MH, Espinosa BJ, Chávez OA. Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax* in Latin America: polymorphism and evolutionary relationships of the circumsporozoite gene. *Malar J.* 2013; 12:243.

Gutiérrez-López S. Polimorfismo de la región C-terminal de la proteína de superficie del merozoíto-1 de *Plasmodium vivax* colectados en Nicaragua. Tesis de Maestría CRISP\_INSP 2014.

Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki T, Ferreira MU, Kanbara H, Hughes AL. Mitochondrial genome sequences support ancient population expansion in *Plasmodium vivax*. *Mol Biol Evol.* 2005; 22:1733–1739.

Joy DA, Gonzalez-Ceron L, Carlton JM, Gueye A, Fay M, McCutchan TF, Su XZ. Local adaptation and vector-mediated population structure in *Plasmodium vivax* malaria. *Mol Biol Evol.* 2008; 25(6):1245-52.

Librado, P. & Rozas, J., 2010. DnaSP.

Mu J, Joy DA, Duan J, Huang Y, Carlton J, Walker J, Barnwell J, Beerli P, Charleston MA, Pybus OG, Su XZ. Host switch leads to emergence of *Plasmodium vivax* malaria in humans. *Mol Biol Evol.* 2005; 22(8):1686-93

- Nóbrega-Souza T, Carvalho LH, Alves-Brito CF. Worldwide genetic variability of the Duffy binding protein: insights into Plasmodium vivax vaccine development. PLoS One. 2011; 6(8).
- Ntumngia FB, Rey CL, Adams JH. Conserved and variant epitopes of Plasmodium vivax Duffy binding protein as targets of inhibitory monoclonal antibodies. Infect Immun. 2012; 80(3):1203-8.
- Pan American Health Organization. Report on the situation of malaria in the Americas, 2008. Washington, DC, USA: Pan American Health Organization 2011.
- Pan American Health Organization. Report on the situation of malaria in the Americas, 2011. Washington, DC, USA: Pan American Health Organization 2013.
- Putapornit C, Jongwutiwes S, Grynberg P, Cui L, Hughes AL. Nucleotide sequence polymorphism at the apical membrane antigen-1 locus reveals population history of Plasmodium vivax in Thailand. Infect. Genet. Evol. 2009; 9:1295-1300.
- Rodrigues PT, Alves JM, Santamaria AM, Calzada JE, Xayavong M, Parise M, da Silva AJ, Ferreira MU. Using mitochondrial genome sequences to track the origin of imported Plasmodium vivax infections diagnosed in the United States. Am J Trop Med Hyg. 2014; 90(6):1102-8
- Taylor JE, Pacheco MA, Bacon DJ, Beg MA, Machado RL, Fairhurst RM, Herrera S, Kim JY, Menard D, Póvoa MM, Villegas L, Mulyanto, Snounou G, Cui L, Zeyrek FY, Escalante AA. The evolutionary history of Plasmodium vivax as inferred from mitochondrial genomes: parasite genetic diversity in the Americas. Mol Biol Evol. 2013; 30(9):2050-64.
- Tomasini-Ovilla HA. Análisis de polimorfismo de la Proteína de Unión al Antígeno Duffy (DBPII) del merozoíto de Plasmodium vivax que circula en Nicaragua. Tesis de Licenciatura CRISP-INSP 2015.
- VanBuskirk KM, Cole-Tobian JL, Baisor M, Sevova ES, Bockarie M, King CI, Adams JH. Antigenic drift in the ligand domain of Plasmodium vivax duffy binding protein confers resistance to inhibitory antibodies. J. Infect. Dis. 2004; 1(190):1556-1562.
- World Health Organization: Guidelines for the treatment of malaria. 2nd edition. Geneva, Switzerland: WHO press; 2013.
- World Health Organization: Guidelines for the treatment of malaria. 2nd edition. Geneva, Switzerland: WHO press; 2014.

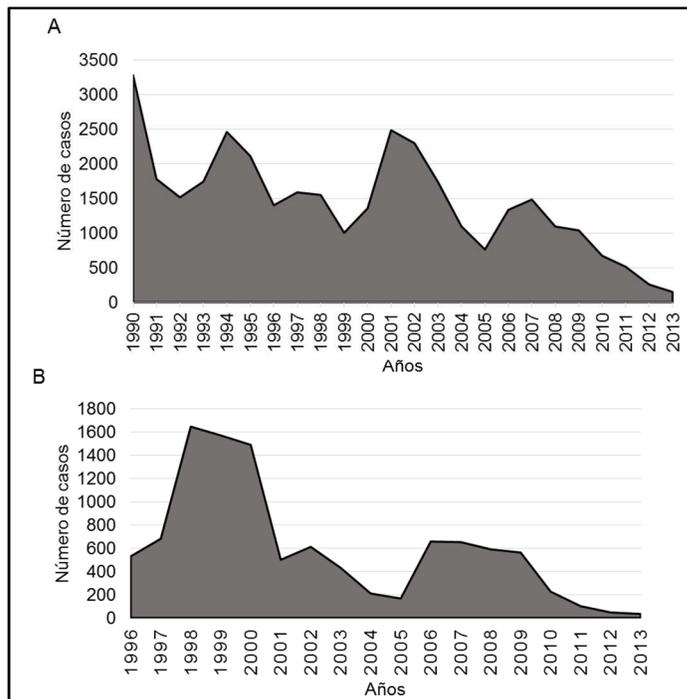
## Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
DBP	Proteína de Unión al Receptor Duffy
<i>PvdbpII</i>	Gen que codifica al Dominio II de la Proteína de Unión al Receptor Duffy
<i>Pvcitb</i>	Gen mitocondrial <i>Citocromo b</i>
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
CRISP	Centro Regional de Investigación en Salud Pública
INSP	Instituto Nacional de Salud Pública
F <sub>ST</sub>	Índice de Diferenciación genética
R <sub>m</sub>	Eventos mínimos de Recombinación
M	Mutaciones
H <sub>d</sub>	Diversidad Haplotípica
Π	Índice Pi
θ <sub>w</sub>	Índice teta
R <sub>g</sub>	Parámetro de recombinación por gen
SR	parámetro de recombinación entre sitios adyacentes
H	Haplotipo
R	Arginina
K	Lisina
N	Asparagina
W	Triptófano
I	Isoleucina
S	Serina
G	Glicina
SM <sub>x</sub>	Sur de México
NIC	Nicaragua
CA	Centro América
BRA	Brasil
VEN	Venezuela
PER	Perú
COL	Colombia
TUR	Turquía
PAK	Pakistán
IDN	Indonesia
THA	Tailandia
CHI	China
IND	India

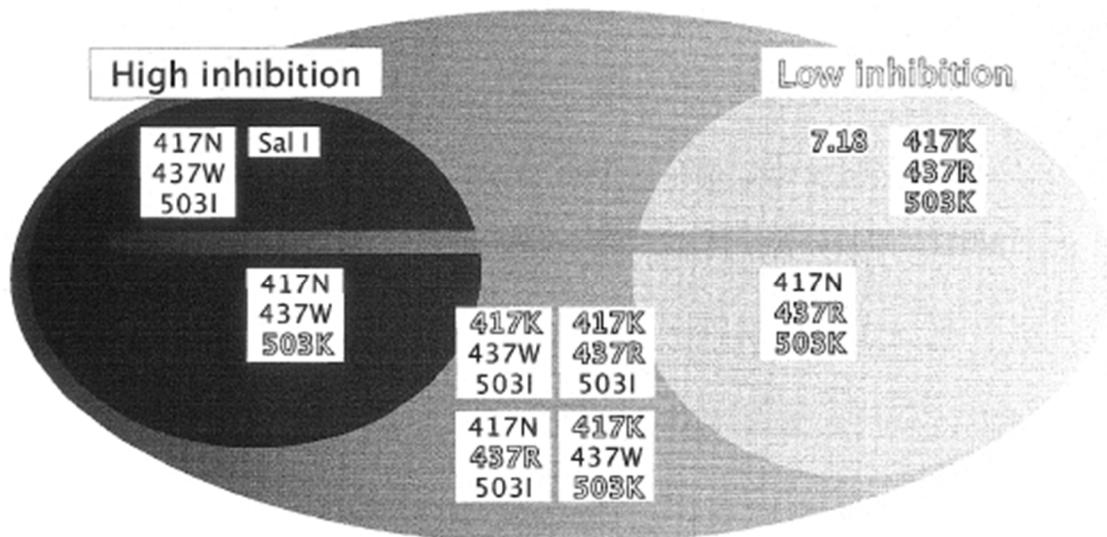
PNG	Papúa Nueva Guinea
SK	Corea del Sur
MAD	Madagascar
CAM	Cambodia
MYA	Myanmar

---

**Anexo 1.** Casos de Paludismo por *P. vivax* confirmados y registrados. A) para el Estado de Chiapas durante el periodo s 1990-2013; B) para la Jurisdicción VII del Estado de Chiapas, durante 1996-2013 (datos disponibles).



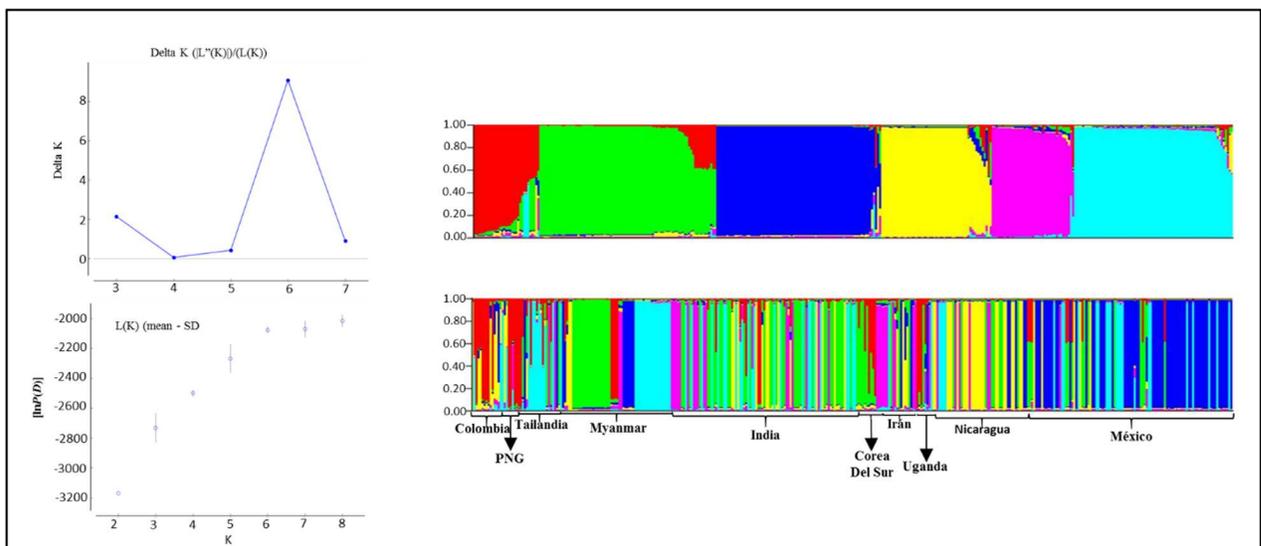
**Anexo 2.** Polimorfismos en los residuos de *PvdbpII* 417, 437, 503 y su efecto en la inhibición por anticuerpos bloqueadores inducidos contra la variante silvestre NWI: Tomada de Vanbuskirk *et al.*, (2004).



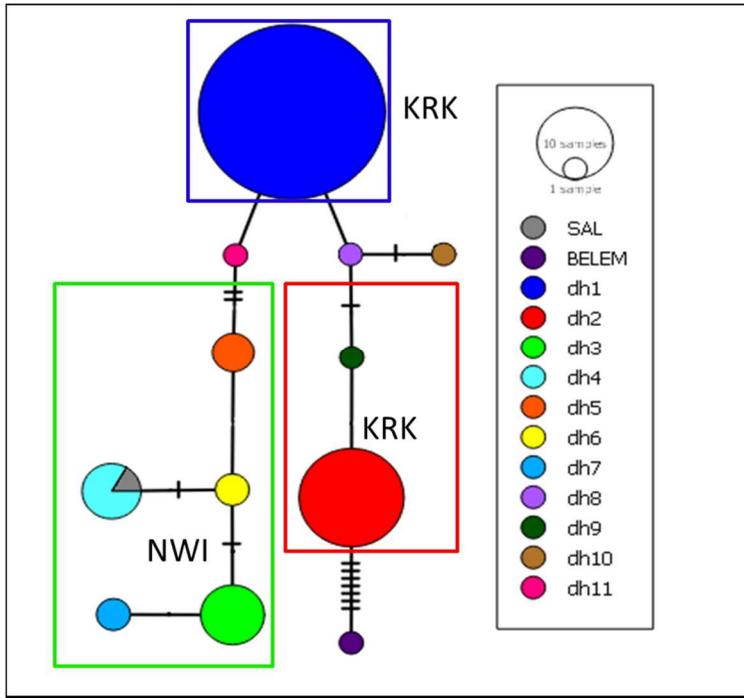
**Anexo 3.** Frecuencia de polimorfismos por periodo de tiempo del gen *PvdbpII* en parásitos del Sur de México.

<b>R<sup>o</sup>posición del codón</b>	308	370	384	385	386	390	417	424	437	503	529	531
<b>R<sup>o</sup>nucleótidos</b>	agg	aaa	gat	gaa	aag	cgt	aat	Tta	tgg	Ata	gaa	Aac
<b>R<sup>o</sup> amino ácido</b>	Arg	Lys	Asp	Gly	Lys	Arg	Asn	Leu	Trp	Ile	Glu	Asn
<b>Cambio de aa</b>	Ser	Glu	Gly	Glu	Asn	His	Lys	Ile	Arg	Lys	Lys	-
<b>Período</b>	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
<b>1993-1995 (n=25)</b>	12	24	40	12	12	24	64	64	64	64	24	24
<b>2000-2002 (n=20)</b>	35	35	35	35	35	20	70	70	70	75	5	5
<b>2006-2007 (n=35)</b>	17	20	34	17	17	11	89	89	86	91	6	6
<b>2010-2011 (n=22)</b>	18	18	18	18	18	0	100	100	100	100	0	0

**Anexo 4.** Análisis de la estructura genética de *P. vivax* basado en *PvdbpII*. Se distinguieron seis subpoblaciones pero a nivel global se observó poca estructuración por ejemplo SMX, NIC, COL muestran poblaciones parcialmente diferenciadas. Se incluyeron 378 aislados de distintos sitios geográficos.



**Anexo 5.** *P. vivax*: relaciones genéticas de los haplotipos *PvdbpII*. La red de haplotipos nos muestra cómo se relacionan los haplotipos detectados y su agrupación en subpoblaciones (indicado por el color del marco). Para cada grupo de haplotipos se indica el fenotipo dado por los residuos 417-437-503; principalmente NWI y KRK.



**Anexo 6.** Subpoblaciones de *P. vivax* mediante un fragmento del gen *Pvcitb* (nucleótidos 745-1619) en el Sur de México, 2001-2007. Se muestran la gráfica Delta K que indica que lo más probable es la presencia de tres subpoblaciones y la gráfica L (K). Se muestran las figuras de la estructura genética de acuerdo a K2, K3 y K4, en todas se indican dos subpoblaciones, para K3 y K4 sugiere que están conformadas por poblaciones mezcladas.

