INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO

Título

Estructura genética de *Plasmodium vivax* usando el gen del Antígeno Apical de Membrana 1 ($PvAMA1_{I-II}$) en Nicaragua, 2012-2013.

Artículo para obtener el grado de Maestro en Ciencias de la Salud con Área de Concentración en Enfermedades Transmitidas por Vector

DIDIER CASANOVA HERNÁNDEZ

GENERACIÓN 2014-2016

Director de Tesis:

Dr. René Cerritos Flores

Asesor: Dra. Lilia González Cerón

Lector: Dra. Teresa López Ordoñez

Centro Regional de Investigación en Salud Pública

Tapachula, Chiapas **Agosto, 2016**

Este trabajo es parte 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 del Centro Regional de Investigación en Salud Pública.

Estructura genética de *Plasmodium vivax* usando el gen del Antígeno Apical de Membrana 1 ($PvAMA1_{I-II}$) en Nicaragua, 2012-2013.

Articulo sometido de acuerdo a los requisitos 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

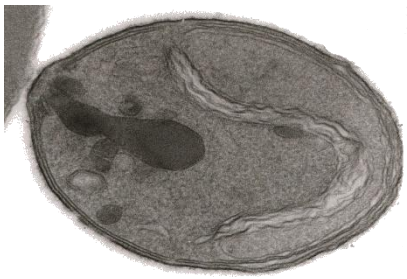
Por:

I.B.T. Didier Casanova Hernández

Agosto de 2016

Para mí familia

Gracias sinceramente ♉



Merozoíto de Plasmodium

AGRADECIMIENTOS

Sinceramente a la Dra. LILIA GONZÁLEZ CERÓN y al Dr. RENÉ CERRITOS FLORES.

Dr. René Cerritos Flores gracias por apoyo, paciencia, enseñanzas durante la realización de la tesis. Debo a usted el conocimiento adquirido en el área de genética de poblaciones. Gracias por el tiempo brindado, sus conocimientos compartidos, durante la realización, análisis, la presentación e interpretación del trabajo.

Dra. Lilia González Cerón, que depositó en mi confianza desde el primer día, para llevar a cabo este trabajo de tesis. Por guiarme y orientarme desde el principio hasta el final del trabajo. Por sus conocimientos y experiencia en el trabajo. Por su paciencia y tiempo brindado, fueron valiosas las horas porque ayudaron a comprender mejor el trabajo y ser mejor profesional.

Dra. Lilia y Dr. René, gracias por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

Al 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 equipo de trabajo del laboratorio de Inmunoparasitología molecular, al QFB Marco Alessio Sandoval Bautista, quien colaboró en la georreferenciación, elaboración del mapa y en todo momento me brindó sus consejos. A la QFB. Frida Santillán Valenzuela, por su apoyo en el trabajo y a la QFB Olga L. Palomeque por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Teresa López Ordóñez, por su valiosa contribución en la revisión de la tesis. Gracias por su tiempo y disposición para ayudarme en todo lo que necesitaba, gracias por su amistad y sus consejos.

Al M. en C. Sleider Gutiérrez López, por su asesoría y por su tiempo dedicado.

A mis profesores de la maestría.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante la maestría.

Al Centro Regional de Investigación en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud Pública (CRISP/INSP), por ser mi alma mater durante mi formación como maestro.

CONTENIDO

RESUMEN---------- **1**

INTRODUCCIÓN---------- **2**

METODOS---------- **3**

Antecedentes y descripción la base de secuencias---------- **4**

Análisis genéticos---------- **4**

Polimorfismo---------- **4**

Diversidad genética---------- **5**

Selección Natural---------- **5**

Diferenciación genética (índice F_{ST})---------- **6**

Red de haplotipos---------- **6**

RESULTADOS---------- **6**

Polimorfismo genético en la proteína PvAMA1$_{I\text{-}II}$---------- **6**

Distribución geográfica de los haplotipos p*vama1*$_{DI\text{-}DII}$ por Municipio de Nicaragua---------- **8**

Diversidad genética del gen *pvama1*$_{DI\text{-}DII\text{-}}$---------- **9**

Pruebas de neutralidad---------- **9**

Recombinación y desequilibrio de ligamento---------- **11**

Diferenciación genética---------- **12**

Red de haplotipos ---------- **13**

DISCUSIÓN ---------- **14**

REFERENCIAS---------- **17**

RESUMEN

El paludismo causado por *Plasmodium vivax* produce alta incidencia en zonas tropicales y subtropicales a nivel mundial. Los estudios genéticos a través de marcadores moleculares contribuyen a una mejor comprensión de la dinámica de la transmisión y dispersión de las poblaciones de *P. vivax*: Dicha información podría ser útil para fortalecer las medidas de control y en la vigilancia epidemiológica de la enfermedad. En este trabajo se analizó la estructura genética de *P. vivax* de Nicaragua usando el Antígeno Apical de Membrana ($AMA1_{I-II}$).

Se analizó una base con 57 secuencias de ADN, de un fragmento de 915 pb del gen *pvama1* DI-DII de parásitos obtenidos durante 2012-2013 en zonas afectadas de Nicaragua. Se compararon los índices de diversidad genética de los dominios DI *vs* DII, la selección natural, el índice F_{ST}, parámetros de recombinación, y las relaciones genealógicas de los haplotipos DI-DII.

Se encontraron 24 polimorfismos, de los cuales 14 de tipo no sinónimos y los cinco de tipo sinónimo se detectaron en el dominio DI. La diversidad fue mayor en DI (π=0.00780; θ=0.00764) que en DII (π=0.00318, θ=0.00318), similar a lo observado en otros sitios geográficos. La prueba D de Tajima para el dominio DI y DII del gen *pvama1* mostró un valor positivo pero no fueron significativos (0.0604 y 0.4847), mientras el valor *dN-dS* fue positivo para ambos dominios, pero sólo fue significativo para DI (2.2945). Mientras para Nicaragua la presión de selección fue positiva para el gen *pvama1*, en otros parásitos de América como de México y Venezuela la presión de selección fue balanceadora. Ocho de los 11 haplotipos identificados fueron exclusivos de Nicaragua, siendo el H1 el más frecuente y se detectó en los diferentes municipios en la RAAN, pero un poblado que fronteriza con Honduras presentó el mayor número de haplotipos. En la zona afectada del pacifico se detectó un haplotipo distinto. Los valores de F_{ST} fueron bajos entre parásitos de Nicaragua y Venezuela (DI, 0.02891 *vs* DI-DII, 0.07385), y altos entre Nicaragua y el sur de México (DI, 0.17572 *vs* DI-DII, 0.21608), con sitios fuera de América los valores fueron entre 0.1222 y 0.6544. En congruencia, la red de haplotipos mostró que los parásitos de Nicaragua se agruparon en tres grupos genealógicos muy relacionados a los parásitos de Venezuela.

Estos resultados sugieren que los parásitos de Nicaragua corresponden a una población bien diferenciada, producto de un incipiente proceso de diversificación, diferentes eventos migración y reciente dispersión a nivel local. Esta información aporta datos importantes para la consideración de los programas de control y la vigilancia epidemiológica.

Palabras claves: *Plasmodium vivax,* Nicaragua, estructura genética, Antígeno Apical de Membrana 1, AMA1, *pvama1*, DI, DII, polimorfismo, diversidad genética, haplotipos, diferenciación genética, red de haplotipos.

INTRODUCCIÓN

Plasmodium vivax es la especie causante de paludismo con el mayor índice de morbilidad y él más ampliamente distribuido a nivel mundial. En las Américas se estima que se producen anualmente 427 mil casos, donde el 75% es causado por esta especie (WHO, 2014). Nicaragua ha experimento una disminución del 97% en los casos reportados entre 2000 y 2010, de 23,878 a sólo 692 casos respectivamente (WHO, 2011), pero el número de casos ha incrementado los últimos años a más de 1,163 casos en el 2014 (WHO, 2015). *P. vivax* causa el 82% de los casos (WHO, 2014) y se encuentra en fase de control (WHO, 2014; González-Cerón *et al.,* 2015).

Los estudios de diversidad y estructura genética nos brindan información de cómo distintos alelos son generados y se dispersan en las regiones afectadas y si dichos cambios o ajustes repercuten en su biología (Arnott *et al.,* 2012), como los mecanismos de patogenicidad en el humano, la epidemiologia de la transmisión y la diversidad de las moléculas candidatas para vacunas.

En su ciclo de vida *Plasmodium spp.* experimenta múltiples fases que varían en su antigenicidad. La fase móvil, el merozoíto, invade a los reticulocitos por una serie de procesos complejos ligando - receptor (Lobo y Kumar, 1998). El antígeno apical de membrana 1 (AMA1) participa en la reorientación del merozoíto, proceso que antecede la invasión del reticulocito (Cowman y Crabb, 2006). Por la importancia en la invasión al

reticulocito, su inmunogenidad y la capacidad de inducir anticuerpos bloqueadores de la invasión es un candidato para vacunas (Kennedy *et al.*, 2002).

La proteína AMA1 es transmembranal y el gen que la codifica se localiza en el cromosoma 9 y es secretada por los micronemas. Esta se conforma de una secuencia señal N-terminal, un dominio citoplasmático C-terminal, una región transmembranal y un ectodominio (Yandar *et al*., 2008). El ectodominio se compone por tres dominios (DI, DII y DIII) y 16 residuos de cisteínas conservadas (Hodder *et al*., 1996; Pizarro *et al*., 2005; Gunasekera *et al*., 2007). Durante la invasión, los dominios I y II conforman el sitio de unión al ligando entre el merozoíto-reticulocito (Alexander *et al.,* 2005; Lamarque *et al.,* 2011).Se ha descrito que el ectodominio en *P. falciparum* y *P. vivax* es altamente inmunogénico (Mital *et al*., 2005). En la infección natural con *P. vivax*, la respuesta de anticuerpos va dirigida contra el DII (proteína recombinante) y ratones inmunizados con distintas proteínas recombinantes del ectodominio, también desarrollan títulos altos contra la recombinante DII (Múfalo *et al.*, 2008).

Un estudio reciente usando la proteína de superficie del merozoíto 1(MSP1) mostró que las poblaciones de *P. vivax* en Nicaragua son genéticamente diversas (Gutiérrez *et al*., 2016), se detectaron muchos haplotipos exclusivos de la región y el análisis genealógico expuso cuatro linajes y procesos de diversificación, dos haplotipos muy frecuentes en Nicaragua y relacionados con parásitos de América y otros dos relacionados a parásitos de otros sitios geográficos (Gutiérrez *et al*., 2016). Para comprender mejor la diversidad de las poblaciones de *P. vivax* circulantes en Nicaragua se analizó la estructura genética del Antígeno Apical de Membrana 1 dominios DI y DII (*pvama1* $_{DI\text{-}DII}$).

METODOS

El estudio comprendió el análisis de bases de datos previamente obtenidas dentro proyecto **CI: 1042, código 47-6739** "Estudio molecular de los parásitos de *P. vivax* que persisten en México y Nicaragua" que fue aprobado por las comisiones de ética y bioseguridad del Instituto Nacional de Salud Pública en el 2011.

Antecedentes y descripción de la base de secuencias

Las muestras de sangres infectadas con *P. vivax* 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) cercano al océano Atlántico y de la región de Chinandega próxima con el océano Pacífico, durante el periodo 2012 y 2013. El diagnóstico de paludismo se realizó mediante el análisis microscópico de gota gruesa. A los pacientes que salieron positivos a la infección con *P. vivax* por microscopia se les solicitó su consentimiento informado para la toma de muestra, de sangre capilar, que fue impregnada en papel filtro Whatman #2. Las muestras de sangre se secaron y preservaron en sílica gel, en la oscuridad.

El ADN se extrajo usando el kit comercial Qiagen Qiamp blood (Qiagen CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación del segmento de ADN de interés se realizó mediante una PCR anidada, usando primers específicos (González-Cerón *et al.*, 2015; Piedra, 2015). Los productos de PCR se purificaron con el kit comercial MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia CA), se secuenciaron en ambos sentidos por el método de Sanger en la Unidad High Throughput Genomics, Departament of Genome Sciences, Universidad de Washington, Seattle, USA.

Finalmente se obtuvieron y revisaron las secuencias consenso (la base para trabajar consistió en 57 secuencias de ADN; de Waspam (n=15), Puerto Cabezas (n=3), Bonanza (n=15), Siuna (n=4) y Rosita (n=17) del RAAN y Viejo Sur (n=4) de la región del Pacifico El tamaño de las secuencias fue de 915 nucleótidos (nucleótido 316-1230; codones 106-305) según la cepa de referencia Sal 1.

Análisis genéticos

Polimorfismo. Se identificaron los cambios de nucleótidos sinónimos y no sinónimos y en su caso las sustituciones de aminoácidos y se utilizó como referencia las secuencias de las cepas Salvador 1 (XM_001614792) y Belem (AF435594).

Los análisis de estructura genética se realizaron para cada dominio y el segmento completo

del gen *pvama1* de las poblaciones de parásitos de Nicaragua y otros orígenes geográficos. Las secuencias del mismo gen y de diferentes zonas geográficas se obtuvieron del Gen Bank: India (IND), n=60 EF025187 - EF025197 (Rajesh *et al*., 2007), EU282774 - EU282822 (Thakur *et al*., 2008), Sri Lanka (SLK), n=22 EF218679 - EF218701 (Gunasekera *et al*., 2007), Venezuela (VNZ), n=72 EU346015 - EU346087 (Ord *et al*., 2008), Tailandia (THL), n=230 FJ784891 - FJ785121 (Putaportip *et al*., 2009), Irán (IRN), n=37 JF682785 - JF682790 (Montevalli no publicado), JX624732 - JX624760 (Zakeri *et al*., 2013), KF435081 - KF435083 (Moradi, no publicado), Papúa Nueva Guinea (PNG), n= 101 KC702402 - KC702503 (Arnott *et al*., 2013), Corea (KR), n=64 KM230319 - KM230384 (Kang *et al*., 2015), México (MX), KP759815 - KP759849 (González-Cerón *et al.*, 2015).

Diversidad genética. Se calcularon los índices de diversidad genética: π-($\pi=2\Sigma i-jdij/(n(n-1))$ que es el promedio 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 $a= 1+1/2 + \ldots +1/n-1$, donde n es el número de secuencias en la muestra (Watterson, 1975). Además se identificaron los sitios polimórficos (S), tipo de mutaciones y número de haplotipos (H), así como la diversidad haplotídica usando el software DnaSP v5.10.01 (Librado y Rozas, 2009).

Selección Natural. Para investigar si los fragmentos de ADN están bajo presión de selección se calcularon el número de mutaciones sinónimas (s) y no sinónimas (ns). Se calculó la diferencia entre las tasas de sustituciones sinónimas y no sinónimas (*dN-dS*) que se presentaron en cada dominio del gen utilizando la hipótesis neutra. Se utilizó el método de Nei-Gojobori con corrección de Jukes-Cantor con un error estándar determinado por 500 bootstrap utilizando el software MEGA 7.0 (Tamura *et al*., 2011; Nei y Gojobori, 1986). También se determinó la prueba estadística de D de Tajima, la cual analiza la distribución de la variación nucleotídica. Los valores obtenidos para Nicaragua se compararon con los resultados de otros países. El valor de cero indica la neutralidad, los valores positivos una presión de selección positiva o balanceadora y los valores negativos una presión de selección negativa o purificadora.

Se determinaron los eventos mínimos de recombinación (Rm) y el índice de desequilibrio

de ligamento R^2 mediante el programa DNAsp (Librado y Rozas, 2009).

Diferenciación genética (índice F_{ST}). El análisis estadístico F_{ST} se realizó mediante comparaciones pareadas entre los sitios polimórficos mediante el modelo de Kimura 2, utilizando el software DNAsp v5.10.01 (Librado y Rozas, 2009). Los valores van de cero a 1.0: 0.0-0.05 indica que las poblaciones son idénticas, 0.06-0.15 que las poblaciones están moderadamente diferenciadas, 0.16-0.25 que las poblaciones son diferenciadas más de 0.25 que son altamente distintas (Balloux y Lugon-Moulin, 2002).

Red de haplotipos. Se analizaron las relaciones genealógicas entre los haplotipos de *pvama1* $_{DI-DII}$ de los parásitos de Nicaragua con los presentes en otras regiones geográficas. Para construir la red de haplotipos se utilizó el software popART v1.7 y se verificaron los pasos mutaciones mediante el software TCS 1.21 el cual usa predicciones de la teoría de coalescencia (Clement *et al*., 2000).

RESULTADOS

Polimorfismo genético en la proteína PvAMA1$_{DI-DII}$

En 57 secuencias de 915 pb (nucleótidos 316-1230) se encontraron 24 cambios de nucleótidos, de los cuales 19 fueron de tipo no sinónimo y cinco fueron de tipo sinónimos. Se identificaron 11 haplotipos numerados de acuerdo a la proporción encontrada (H1-H11). La mayoría de los cambios se detectaron en el dominio I que comprende el fragmento de nucleótidos 316 – 744 (429pb) fueron 19 cambios; cinco de tipo sinónimo y 14 de tipo no sinónimos. En el dominio II (745 - 1230; 486pb) se encontraron cinco cambios todos de tipo no sinónimos (Tabla 1). Ninguno de los haplotipos fue idéntico a la secuencia de la cepa Sal I o la cepa Belem.

Tabla 1. Polimorfismo de nucleótidos y aminoácidos del fragmento AMA1$_{DI-DII}$ de *Plasmodium vivax* de Nicaragua, 2012 – 2013.

Dominio:		DI														DII					
Posición del codón*		106	107	112	120	130	132	137	140	141	145	189	190	227	228	277	288	352	368	380	384
Residuo*		Ser	Asp	Arg	Lys	Asn	Asn	Pro	Leu	Ala	Glu	Glu	Lys	Glu	Ser	Glu	Gly	Lys	Lys	Gln	Leu
Codón*		tct	gac	aga	aag	Aat	Aat	cca	tta	gcg	gaa	Gaa	Aaa	gaa	agc	gag	gga	aag	aaa	caa	ctg
H	N																				
1	32	…	…	…	…	…	…	..C	a..	…	.c.	…	…	…	…	a..	…	…	…	a..	.c.
2	7	..C	.cT	.cC	.g.	..g	g..	..C	…	…	…	…	…	…	…	a..	…	…	…	…	…
3	5	..C	..T	.cC	.g.	..g	g..	..C	…	.a.	.c.	…	…	…	…	a..	…	..t	…	…	…
4	4	..C	.cT	.cC	.g.	…	…	..C	…	.a.	.c.	a..	c..	…	…	a..	…	…	…	…	…
5	3	..C	.cT	.cC	.g.	…	…	..C	…	.a.	.c.	a..	c..	.t.	gaT	a..	…	…	…	…	…
6	1	..C	.cT	.cC	.g.	..g	g..	..C	…	.a.	.c.	…	…	…	…	a..	…	…	…	…	…
7	1	..C	..T	.cC	.g.	..g	g..	..C	…	.a.	.c.	a.t*	…	…	…	a..	…	..t	…	…	…
8	1	…	…	…	…	…	…	..C	a..	…	.c.	…	…	…	…	a..	…	…	.t.	…	.c.
9	1	…	…	…	…	…	…	..C	a..	…	.c.	…	…	…	…	a..	…	…	…	…	.c.
10	1	..C	..T	.cC	.g.	…	…	…	…	…	…	…	…	…	…	…	…	…	.t.	…	.c.
11	1	..C	.cT	.cC	.g.	…	…	..C	…	.a.	.c.	a..	c..	…	…	a..	…	..t	…	…	…
Cepa Belem		..C	.cT	.a.	.g.	…	…	..C	…	.a.	.c.	…	…	…	…	a..	.a.	…	…	.g.	…
Cambio del Residuo		-	Ala	Thr	Arg	Lys	Asp	-	Ile	Glu	Ala	Lys/Asn	Gln	Val	Asp	Lys	Glu	Asn	Ile	Lys	Pro

*Cepa Salvador I (XM_001615397); cepa Belem, EU395595; N, número de parásitos. Los residuos de aminoácidos se representan en código de tres letras; Los nucleótidos en mayúsculas representan cambios sinónimos. Los nucleótidos en minúscula cambios no sinónimos.

Distribución geográfica de los haplotipos del gen *pvama1*$_{DI-DII}$ por Municipio de Nicaragua

En la figura 1 se observa la distribución geográfica de los 11 haplotipos. El haplotipo H1 se detectó en los diferentes municipios de la región de la RAAN. Los haplotipos H2 y H3 se detectaron en Bonanza y Rosita, y en Rosita y Siuna, respectivamente. Pero los demás haplotipos fueron únicos; el haplotipo H7 se detectó en Rosita, H9 en Bonanza, mientras los haplotipos H5, H6, H10 y H11 se detectaron en Waspam. El haplotipo H4 fue detectado en el municipio del Viejo Sur.

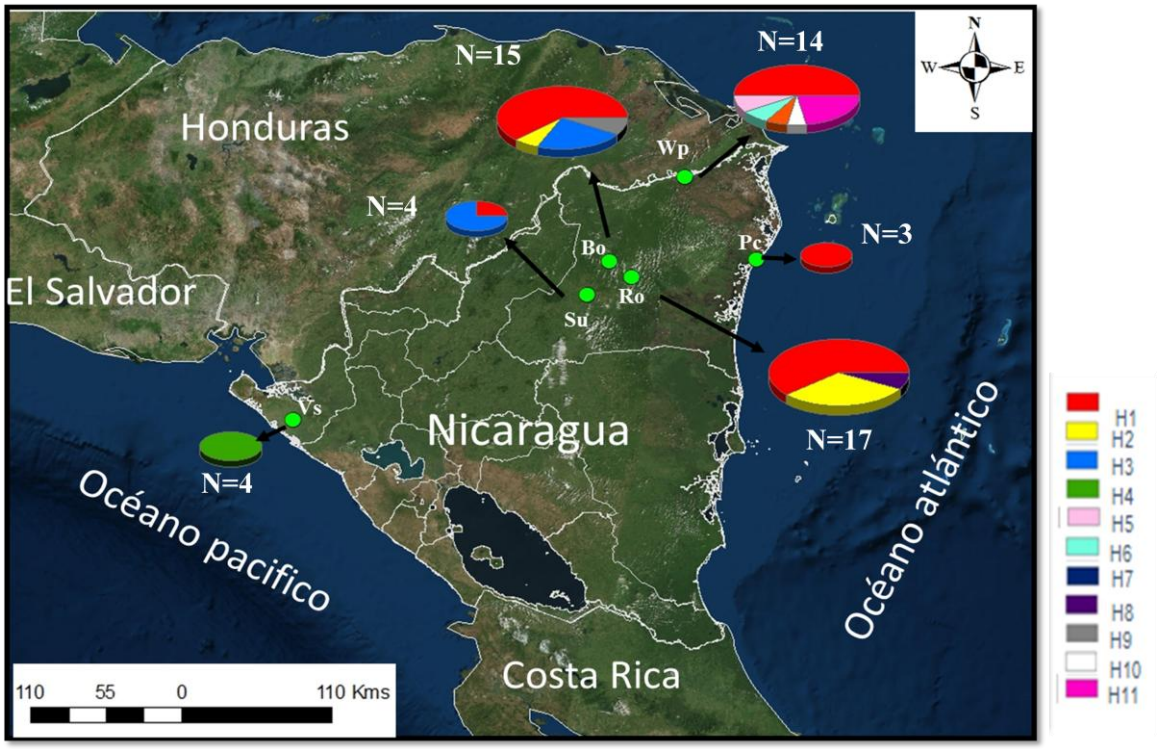


Figura 1. Distribución geográfica de los haplotipos de *P. vivax ama1*$_{DI-DII}$ por Municipio en Nicaragua; Rosita (Ro), Bonanza (Bo), Waspam (Wp), Siuna (Su), Puerto cabezas (Pc) y Viejo Sur (Vs). N, numero de muestras/ se representa por el tamaño del círculo. Los haplotipos están indicados con colores: H1, rojo; H2, amarillo; H3, azul; H4, verde; H5, rosa pálido; H6, azul agua; H7, naranja; H8, morado; H9, gris; H10, blanco; H11, rosa intenso.

Diversidad genética del gen *pvama1*$_{DI-DII.}$

Se compararon los parámetros genéticos del dominio DI (342 nucleótidos; nt 376 – 744 (codones 126-248), DII 745- 1155 (codones 249-385) con el fragmento completo DI-DII; 780 nucleótidos; 376 – 1155 (codones 126-385) de aislados de *P. vivax* de Nicaragua. En parásitos de Nicaragua la diversidad nucleotídica y genética del dominio DI (π=0.0078, θ=0.00764) fue más alta que la del DII (π=0.00318; θ=0.00264). Así se observó para los demás sitios geográficos (Tabla 2), excepto para *P. vivax* en SLK, aquí la diversidad fue similar en ambos dominios.

La diversidad haplotídica del DI en Nicaragua fue más baja que otras regiones geográficas como MX y VNZ. En general, los parásitos de estos tres sitios de América tuvieron menor diversidad que otros sitios afuera del continente (Tabla 2). La mayor diversidad se observó en IND, IRN y THL.

Pruebas de neutralidad

La prueba D de Tajima para el dominio DI del gen *pvama1* de Nicaragua mostró un valor cercano a la neutralidad (0.0604) siendo el único sitio, donde el valor de DI fue menor que DII (0.4847). Mientras el valor *dN-dS* del DI fue significativamente positivo (2.2945) y aunque para el DII este también fue positiva (1.8397), no fue significativa. Para el fragmento DI-DII el valor fue positivo y significativo. Estos valores difieren de lo que se obtuvo para MX y VNZ; el fragmento DI para MX y VNZ y el fragmento DI-DII sólo para MX la selección fue balanceadora; los valores de D-Tajima y *dN-dS* fueron ambos positivo y significativos.

Para los parásitos de México la prueba D de Tajima fue positiva para DII, y aunque fue positiva para *dN-dS* esta no fue significativa. Para otros países hubo diferencias importantes en el valor *dN-dS*, por ejemplo IRN, sólo DI presentó valor de positivo y significativo, pero para SLK y PNG se presentó un valor positivo significativo para DII y el segmento completo DI-DII, pero no para DI (Tabla 3)

Tabla 2. Parámetros de diversidad genética del gen *pvama1*$_{DI-DII}$ en Nicaragua y otras regiones geográficas.

Origen Geográfico	N	DI						DII						DI-II					
		S	M	H	Hd	π	Θ-w	S	M	H	Hd	π	Θ-w	S	M	H	Hd	π	Θ-w
NIC	57	13	13	7	0.618	0.00780	0.00764	5	5	6	0.610	0.00318	0.00264	18	18	11	0.664	0.00536	0.00500
MX	35	11	11	7	0.723	0.01374	0.00724	3	3	3	0.536	0.00371	0.00177	14	14	7	0.723	0.00846	0.00436
VNZ	73	9	9	10	0.802	0.00898	0.00502	7	7	9	0.818	0.00489	0.00350	16	16	17	0.907	0.00682	0.00422
IRN	38	23	24	23	0.960	0.01691	0.01484	15	16	20	0.939	0.00633	0.00869	38	40	32	0.989	0.01133	0.01160
IND	60	18	19	40	0.979	0.01575	0.01046	16	17	25	0.929	0.00637	0.00835	34	36	51	0.993	0.01081	0.00935
SLK	23	13	13	8	0.830	0.01065	0.00955	12	13	13	0.937	0.00974	0.00791	25	26	15	0.949	0.01017	0.00868
THL	231	21	22	42	0.905	0.01429	0.00946	16	19	54	0.908	0.00713	0.00647	37	41	89	0.927	0.01052	0.00788
SK	66	20	20	14	0.768	0.00891	0.01139	11	11	10	0.682	0.00240	0.00562	31	31	17	0.879	0.00548	0.00835
PNG	102	18	19	17	0.884	0.01291	0.00939	11	13	30	0.935	0.00564	0.00515	29	32	66	0.989	0.00908	0.00715
Global	685	47	51	117	0.9639	0.01650	0.01792	36	40	106	0.9527	0.00661	0.01233	83	91	275	0.9854	0.01129	0.01497

DI (nt 376-744); DII (nt 745-1155); DI-II (nt 376-1155). NIC: Nicaragua, MX: México, VNZ: Venezuela, IRN: Irán, IND: India, SLK: Sri Lanka, THL: Tailandia, SK: sur de Corea, PNG: Papúa Nueva Guinea; N: número de aislados, S: sitios polimórficos, M: número de mutaciones, H: número de haplotipos, Hd: diversidad haplotípica, π: diversidad nucleotídica, Θ-w: diversidad genética. nt, nucleótidos.

Tabla 3. Pruebas de neutralidad del gen *pvama1* de Nicaragua y otras regiones geográficas.

Región	D-Tajima			***dN-dS***		
geográfica	**DI**	**DII**	**DI-II**	**DI**	**DII**	**DI-DII**
NIC	0.06049	0.48471	0.22187	2.2945*	1.8397	3.0650**
MX	2.79704**	2.47009 *	3.04165**	1.5268	1.7785	2.0732*
VNZ	2.06727*	0.97921	1.80329	3.0658**	0.1252	1.8679
IRN	0.31374	-1.02836	-0.25292	2.2998*	0.1785	1.9834
IND	1.31534	-0.85532	0.30368	1.5145	0.6805	1.6727
SLK	0.40451	0.47922	0.47465	1.3471	2.2209*	2.6018*
THL	1.18447	-0.18892	0.58865	0.3685	0.0523	0.3727
SK	-0.66702	-1.59409	-1.10565	-0.0925	0.4276	0.0760
PNG	0.86809	-0.19775	0.45808	1.5879	2.3329*	2.8514**
Global	-0.41218	-1.37175	-0.88533	1.0222	0.9714	0.149

NIC: Nicaragua; MX: Sur de México; VNZ: Venezuela; IRN: Irán; SLK: Sri Lanka; IND: India; THL: Tailandia; SK: Corea; PNG: Papúa Nueva Guinea. *p>0.05< 0.1; **p<0.05 (IC95%)

Recombinación y desequilibrio de ligamento

Para los parásitos de Nicaragua, en $pvama1_{DI}$ se detectó un único evento mínimo de recombinación y ninguno en el DII. En general, los valores de Rm fueron mayores para DI que para DII. Para el DI-DII el valor de Rm se incrementó en una unidad con respecto a la suma DI + DII excepto para parásitos de THL y SK. Para Nicaragua el valor de desequilibrio de ligamiento R^2 fue más alto para el DI que el DII, similar que otros sitios geográficos, excepto MX. Los parásitos de MX mostraron un valor más alto de R^2 para el DII que para DI, 0.997 *vs* 0.6.

Tabla 4. Determinación de recombinación y desequilibrio de ligamento en *pvama1* de diferentes regiones geográficas.

Origen geográfico	DI		DII		DI-II	
	Rm	DL-R^2	Rm	DL-R^2	Rm	DL-R^2
NIC	**1**	**0.4418**	**0**	**0.2527**	**2**	**0.2205**
MX	2	0.6129	0	0.9977	3	0.5326
VNZ	3	0.3212	2	0.0294	6	0.2049
IRN	7	0.2181	2	0.0802	10	0.1100
IND	5	0.1838	3	0.0415	9	0.0750
SLK	3	0.3399	2	0.1230	6	0.2003
THL	7	0.1629	4	0.0974	11	0.0974
SK	2	0.1781	0	0.0423	2	0.0968
PNG	3	0.1654	2	0.0197	6	0.1100
Global	11	0.0380	6	0.0179	17	0.0217

Los análisis se realizaron por separado para cada dominio (DI *vs* DII) y del fragmento completo (DI-DII). Rm, eventos mínimos de recombinación; R^2 coeficiente de desequilibrio de ligamiento, conforme se incrementa el valor es mayor el desequilibrio de ligamiento (DL).

Diferenciación genética

Los valores de F_{ST} usando el dominio DI o el fragmento DI-DII del gen *pvama1* fueron consistentes. Entre *P. vivax* de Nicaragua y VNZ dado por DI y DI-DII del valor de F_{ST} fue el más bajo (0.0289 y 0.0738, respectivamente), mientras que los valores NIC *vs* MX fueron altos; (DI) 0.1757 *vs* (DII) 0.216. NIC *vs* otros países de otros continentes fueron 0.123 - 0.654 usando el DI y entre 0.122 - 0.589 usando DI-DII. Los índices de diferenciación más altos fueron entre Nicaragua y Papúa Nueva Guinea (DI, 0.353; DI-DII, 0.3139) o Corea (DI, .65440) (Tablas 5).

Tabla 5 Índices de F_{ST} para *P. vivax* mediante los dominios DI y DI-DII del gen *pvama1*.

DI

	NIC	MX	VNZ	IRN	IND	SLK	THL	PNG
MX	0.17572							
VNZ	0.02891	0.20809						
IRN	0.12382	0.05626	0.12778					
IND	0.17739	0.08087	0.17301	-0.01431				
SLK	0.17611	0.14665	0.20080	0.06613	0.08603			
THL	0.15634	0.14442	0.16267	0.06882	0.08286	0.03925		
PNG	0.35312	0.24323	0.35100	0.09077	0.09122	0.20517	0.22252	
SK	0.65440	0.46279	0.64848	0.43226	0.43034	0.59570	0.56603	0.48889

DI-DII

	NIC	MX	VNZ	IRN	IND	SLK	THL	SK
MX	0.21608							
VNZ	0.07385	0.18813						
IRN	0.12222	0.08547	0.10298					
IND	0.17502	0.10809	0.13955	-0.00420				
SLK	0.19331	0.14021	0.16826	0.07285	0.07401			
THL	0.21662	0.19835	0.15806	0.10459	0.09349	0.08507		
SK	0.58972	0.42502	0.56222	0.36471	0.35842	0.49029	0.49916	
PNG	0.31396	0.23747	0.28598	0.09427	0.08031	0.17385	0.19935	0.19935

Red de haplotipos

En la red de haplotipos, los once haplotipos encontrados en los aislados de Nicaragua se agruparon en tres grupos genealógicos/linajes relacionados con los parásitos de Venezuela.

El primer grupo fue integrado por los haplotipos H1, H9 y H10. El H1 fue el más abundante y estuvo a un paso mutacional de H10 y dos pasos mutacionales de H9. Otro grupo fue integrado por el haplotipo HII y el tercer grupo fue integrado por siete haplotipos (H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8) (Figura 2).

Ocho haplotipos fueron exclusivos de Nicaragua (H1, H2, H3, H5, H7, H8, H10, y H11) y los otros tres se comparten con haplotipos de *P. vivax* de Venezuela.

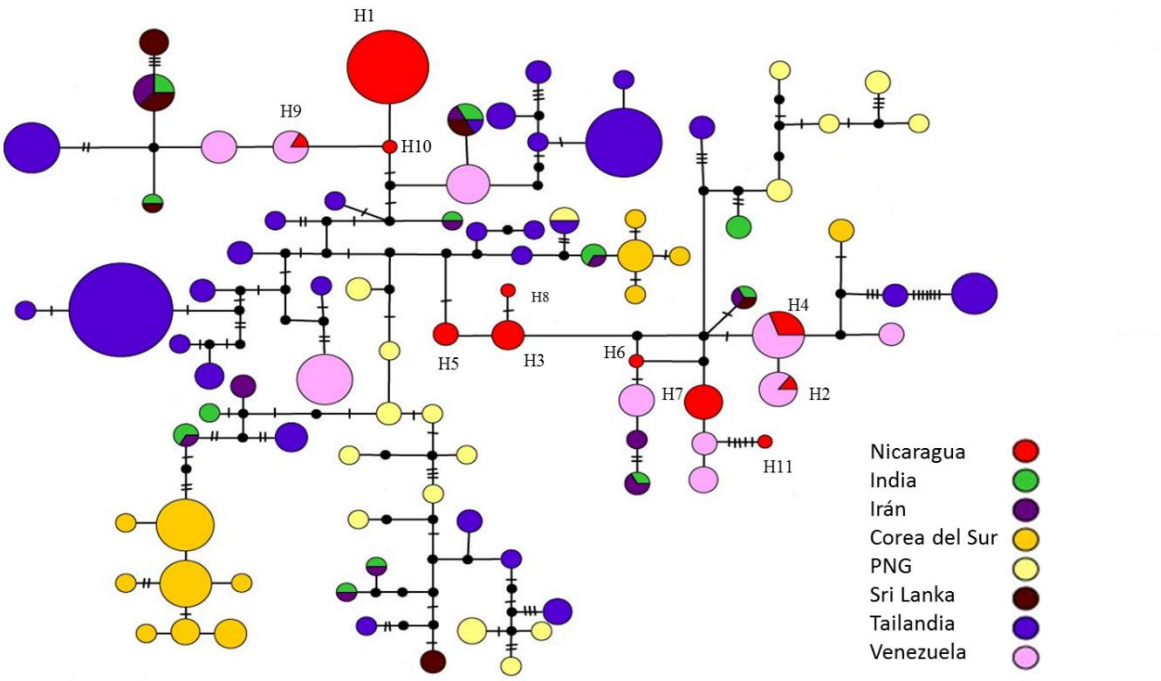


Figura 2. Red de haplotipos de *P. vivax ama1*. Cada círculo corresponde a un haplotipo y el color representa el país de origen. El tamaño del círculo es proporcional al número de aislados que presenta cada haplotipo. Las líneas conectan los haplotipos relacionados y las líneas más cortas que cruzan las de conexión indican el número de pasos mutacionales entre dos haplotipos. Se indican los haplotipos de Nicaragua.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se describió la estructura genética de *Plasmodium vivax* en Nicaragua

usando como marcador molecular el gen *pvama1*$_{DI-DII}$ de muestras colectadas en los años 2012 y 2013. En los estudios realizados en zonas afectadas de otros países de las Américas, como México (González-Cerón *et al*., 2015), Honduras (López *et al.,* 2012), Venezuela (Ord *et al*., 2007), Brasil (Grynberg *et al.,* 2008) y Perú (Chenet *et al*., 2012) se han detectado diferencias importantes en cuanto a la exclusividad y prevalencia de haplotipos, en la diversidad nucleotídica y genética, y distinta intensidad de las fuerzas evolutivas. Por ello es necesario conocer la dinámica evolutiva de las poblaciones circulantes en cada zona afectada, en el caso de *pvama1*, la información obtenida podría ser importante para los programas de control, la vigilancia epidemiológica y para el desarrollo de vacunas. En un trabajo previo en Nicaragua, se analizó la diversidad genética de *pvmsp*$_{42}$ en muestras de los mismos años aquí estudiadas, los valores de diversidad π y θ fue un orden de magnitud mayor (Gutiérrez *et al.,* 2016) que la que se obtuvo en este trabajo para *pvama1*$_{DI-DII}$. En general se ha reportado que el gen *pvmsp*$_{42}$ es más variable que *pvama1*$_{DI-DII}$ para las poblaciones de parásito en la región (González-Cerón *et al*., 2015). Esta diferencia en los parámetros genéticos en estos genes sin duda se debe a las distintas funciones que estos tienen durante el proceso de invasión al eritrocito (Revisando por González-Cerón *et al.*, 2015).

De hecho no solo entre genes existe una marcada variación en la estructura genética, también dentro de los genes, inter y extra dominios, pueden existir variaciones muy marcadas y estas diferencias tal vez se deba en gran parte a las presiones selectivas diferenciales, o en contraparte, simplemente a diferencia en las tasas de evolución de tipo neutral. Por ejemplo, al hacer un análisis del dominio I (DI) y II (DII) del gen *pvama1* de manera independiente se observó que DI es más variable, con mayor recombinación y tiene un valor significativo de estar bajo una presión selectiva de tipo positiva, como se determinó para Nicaragua, VNZ e IRN. Esto podría estar asociado al proceso de evasión del sistema inmune del hospedero (Barry y Arnott, 2014). Sin embargo, en estudios donde se ha evaluado la respuesta de anticuerpos hacia PvAMA1 en infecciones naturales y mediante la inmunización de ratones con proteínas recombinantes se observó una mayor respuesta de anticuerpos contra DII en comparación con DI (Múfalo *et al.,* 2008; Bueno *et al.,* 2011). Sólo en algunos sitios geográficos se observó una presión de selección positiva en DII, como fue PNG y SLK. Es interesante porque DII es mucho más conservado que DI,

así se ha reportado para parásitos de otros sitios geográficos (Gunasakera *et al.*, 2007; Putaporntip *et al.*, 2009; Rastaghi *et al.*, 2014). En los parásitos de Nicaragua, en DII se detectaron sólo mutaciones no sinónimas, mientras en DI se concentraron las mutaciones sinónimas, lo que sugiere una presión de selección negativa o purificadora debido a restricción funcional o estructural en este dominio (Nei y Gojobori, 1986). Estos datos demuestran que el tipo e intensidad de la presión de selección puede variar con la región geográfica.

Una pregunta que se contestó en este trabajo fue la razón de exclusividad de los haplotipos circulantes en Nicaragua así como la relación genealógica que tienen con respecto a los haplotipos previamente reportados en otras regiones del mundo. Este análisis reveló que de los 11 haplotipos detectados, ocho no habían sido previamente reportados y algunos de estos fueron los más prevalentes. Asimismo, se pudo determinar que los tres haplotipos restantes son compartidos con los reportados previamente en Venezuela, pero no con el sur de México. Lo que probablemente refleja que la dinámica de dispersión de los haplotipos circundantes en América y el mundo en gran parte por la movilidad que existe en las poblaciones humanas, hospedero del parásito (Martens y Hall, 2000).

Una vez que un nuevo haplotipo ocurre en una nueva región puede experimentar un proceso de diversificación, seguramente mantenida por procesos diferenciales de selección (Cerritos *et al.*, 2014). En este trabajo se puede sustentar que los linajes aquí identificados, seguramente son producto de diferentes eventos de dispersión y migración, y el que los haplotipos estén conectados entre ellos por un solo paso mutacional podría indicar un incipiente proceso de diversificación. Así mismo, se pudo resolver mediante el análisis de diferenciación entre parásitos de distintos países, que entre Venezuela y Nicaragua existe el menor grado de diferenciación, podrían corresponder a una misma población que recientemente se han diferenciado.

Actualmente Nicaragua se encuentra en fase de control del paludismo (WHO, 2015), al igual que el país vecino Honduras, mientras los otros países con los cuales comparte fronteras, han logrado avanzar hacia la eliminación, como Costa Rica y el Salvador (WHO, 2015). Entre el 2000 y 2011 se ha registrado un descenso de número de casos en Nicaragua, de 22, 645 a 775 respectivamente, pero en el 2013 se reportó un incremento a 1194 casos.

Honduras, por otra parte, presenta una mayor incidencia de casos de paludismo por al menos un orden de magnitud con respecto a Nicaragua. De estos países, la región del atlántico norte es donde la mayor transmisión del paludismo ocurre, que incluye la RAAN en Nicaragua. Es muy probable que aunque Nicaragua tenga eficientes medidas de control, si no se determina el flujo de casos infecciosos Honduras-Nicaragua y viceversa, es muy probable que la RAAN siga con alta incidencia de casos de paludismo, con frecuentes reintroducciones del parásito, en el poblado fronterizo que está justo al lado del rio Coco, el municipio de Waspam, es el municipio donde se detectaron el mayor número de haplotipos. Los resultados que se obtuvieron en este estudio sugieren que, hay que tener un estricto monitoreo en la Región Autónoma del Atlántico Norte (RAAN) y reajustar las medidas de control para impactar la transmisión de forma significativa en un esfuerzo binacional.

REFERENCIAS

Alexander, D. L., Mital, J., Ward, G. E., Bradley, P., y Boothroyd, J. C. (2005). Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. PLoS Pathog, 1(2), e17.

Arnott, A., Barry, A. E., y Reeder, J. C. (2012). Understanding the population genetics of *Plasmodium vivax* is essential for malaria control and elimination. Malaria journal, 11(1), 1.

Arnott, A., Mueller, I., Ramsland, P. A., Siba, P. M., Reeder, J. C., y Barry, A. E. (2013). Global Population Structure of the Genes Encoding the Malaria Vaccine Candidate, *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 (PvAMA-1).PLoS Negl Trop Dis, 7(10), e2506.

Balloux, F., y Lugon-Moulin, N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. Molecular ecology, 11(2), 155-165.

Barry, A. E., y Arnott, A. (2014). Strategies for designing and monitoring malaria vaccines targeting diverse antigens. Frontiers in immunology, 5, 359.

Bueno, L. L., Lobo, F. P., Morais, C. G., Mourão, L. C., de Ávila, R. A. M., Soares, I. S., y Fujiwara, R. T. (2011). Identification of a highly antigenic linear B cell epitope within *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1). PloS one, 6(6), e21289.

Cerritos, R., González-Cerón, L., Nettel, J. A., y Wegier, A. (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(1), 1.

Cowman, A. F., y Crabb, B. S. (2006). Invasion of red blood cells by malaria parasites. Cell, 124(4), 755-766.

Clement, M., Posada, D. C. K. A., y Crandall, K. A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Molecular ecology, 9(10), 1657-1659.

Chenet, S. M., Tapia, L. L., Escalante, A. A., Durand, S., Lucas, C., y Bacon, D. J. (2012). Genetic diversity and population structure of genes encoding vaccine candidate antigens of *Plasmodium vivax*. Malaria journal, 11(1), 1.

González-Cerón, L., Cerritos, R., Corzo-Mancilla, J., y Santillán, F. (2015). Diversity and evolutionary genetics of the three major *Plasmodium vivax* merozoite genes participating in reticulocyte invasion in southern Mexico.Parasites & vectors, 8(1), 1.

Gunasekera, A. M., Wickramarachchi, T., Neafsey, D. E., Ganguli, I., Perera, L., Premaratne, P. H., y Wirth, D. F. (2007). Genetic diversity and selection at the *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 (PvAMA-1) locus in a Sri Lankan population. Molecular biology and evolution, 24(4), 939-947.

Gutiérrez, S., González-Cerón, L., Montoya, A., Sandoval, M. A., Tórres, M. E., y Cerritos, R. (2016). Genetic structure of *Plasmodium vivax* in Nicaragua, a country in the control phase, based on the carboxyl terminal region of the merozoite surface protein-1. Infection, Genetics and Evolution, 40, 324-330.

Grynberg, P., Fontes, C. J. F., Hughes, A. L., y Braga, É. M. (2008). Polymorphism at the apical membrane antigen 1 locus reflects the world population history of *Plasmodium vivax*. BMC evolutionary biology, 8(1), 1.

Hodder, A. N., Crewther, P. E., Matthew, M. L., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., y Anders, R. F. (1996). The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. Journal of Biological Chemistry,271(46), 29446-29452.

Kang, J. M., Lee, J., Cho, P. Y., Moon, S. U., Ju, H. L., Ahn, S. K., y Na, B. K. (2015). Population genetic structure and natural selection of apical membrane antigen-1 in *Plasmodium vivax* Korean isolates. Malaria journal,14(1), 1.

Kennedy, M. C., Wang, J., Zhang, Y., Miles, A. P., Chitsaz, F., Saul, A., y Stowers, A. W. (2002). In vitro studies with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1): production and activity of an AMA1 vaccine and generation of a multiallelic response. Infection and immunity, 7*0*(12), 6948-6960.

Lamarque, M., Besteiro, S., Papoin, J., Roques, M., Vulliez-Le Normand, B., Morlon-Guyot, J., y Kocken, C. H. (2011). The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites.PLoS Pathog, 7(2), e1001276.

Librado, P., y Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 25(11), 1451-1452.

Lobo, C. A., y Kumar, N. (1998). Sexual differentiation and development in the malaria parasite. Parasitology Today, 14(4), 146-150.

Lopez, A. C., Ortiz, A., Coello, J., Sosa-Ochoa, W., Torres, R. E. M., Banegas, E. I., y Fontecha, G. A. (2012). Genetic diversity of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* in Honduras. Malaria journal, 11(1), 1.

Martens, P., y Hall, L. (2000). Malaria on the move: human population movement and malaria transmission. Emerging infectious diseases, 6(2), 103.

Mital, J., Meissner, M., Soldati, D., y Ward, G. E. (2005). Conditional expression of *Toxoplasma gondii* apical membrane antigen-1 (TgAMA1) demonstrates that TgAMA1 plays a critical role in host cell invasion. Molecular biology of the cell, 16(9), 4341-4349.

Múfalo, B. C., Gentil, F., Bargieri, D. Y., Costa, F. T., Rodrigues, M. M., y Soares, I. S. (2008). *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. Microbes and Infection, 10(12), 1266-1273.

Nei, M., y Gojobori, T. (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. Molecular biology and evolution, 3(5), 418-426.

Nei, M., y Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences, 76(10), 5269-5273.

Ord, R. L., Tami, A., y Sutherland, C. J. (2008). AMA1 genes of sympatric *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* from Venezuela differ significantly in genetic diversity and recombination frequency. PLoS One, 3(10), e3366.

Piedra A. FO., 2015. Análisis del Polimorfismo del Antígeno Apical de Membrana-1 (AMA-1_{I-II}) del Merozoíto de *Plasmodium vivax* que circulan en Nicaragua. Tesis Licenciatura. Centro Regional de Investigación en Salud Pública.

Pizarro, J. C., Vulliez-Le Normand, B., Chesne-Seck, M. L., Collins, C. R., Withers-Martinez, C., Hackett, F., y Thomas, A. W. (2005). Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. Science, 308(5720), 408-411.

Putaporntip, C., Jongwutiwes, S., Grynberg, P., Cui, L., y Hughes, A. L. (2009). Nucleotide sequence polymorphism at the apical membrane antigen-1 locus reveals population history of *Plasmodium vivax* in Thailand. Infection, Genetics and Evolution, 9(6), 1295-1300.

Rajesh, V., Elamaran, M., Vidya, S., Gowrishankar, M., Kochar, D., y Das, A. (2007). *Plasmodium vivax*: genetic diversity of the apical membrane antigen-1 (AMA-1) in isolates from India. Experimental parasitology, 116(3), 252-256.

Rastaghi, A. R. E., Nedaei, F., Nahrevanian, H., y Hoseinkhan, N. (2014). Genetic diversity and effect of natural selection at apical membrane antigen-1 (AMA-1) among Iranian *Plasmodium vivax* isolates. Folia parasitologica, 61(5), 385-393.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., y Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular biology and evolution, 28(10), 2731-2739.

Thakur, A., Alam, M. T., Bora, H., Kaur, P., y Sharma, Y. D. (2008). *Plasmodium vivax*: sequence polymorphism and effect of natural selection at apical membrane antigen 1 (PvAMA1) among Indian population. Gene, 419(1), 35-42.

Watterson, G. A. (1975). On the number of segregating sites in genetical models without recombination. Theoretical population biology, 7(2), 256-276.

WHO, 2011. World Malaria Report 2011. Geneva: World Health Organization.

WHO, 2014. World Malaria Report 2014. Geneva: World Health Organization.

WHO, 2015. World malaria report 2015. Geneva: World Health Organization

Yandar, N., Pastorin, G., Prato, M., Bianco, A., Patarroyo, M. E., y Lozano, J. M. (2008). Immunological profile of a *Plasmodium vivax* AMA-1 N-terminus peptide-carbon nanotube conjugate in an infected *Plasmodium berghei* mouse model. Vaccine, 26(46), 5864-5873.

Zakeri, S., Sadeghi, H., Mehrizi, A. A., y Djadid, N. D. (2013). Population genetic structure and polymorphism analysis of gene encoding apical membrane antigen-1 (AMA-1) of Iranian *Plasmodium vivax* wild isolates. Acta tropica, 126(3), 269-279.