PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Diversidad de genes de invasión de reticulocitos en *Plasmodium vivax* ecuatorianos

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas

Andrés Esteban Núñez Vaca

Quito, 2018

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del Sr. Andrés Esteban Núñez Vaca ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Fabián Ernesto Sáenz Calderón
Director de la Disertación
Quito, 16 de marzo de 2018

“Y esta mecánica eternamente ininterrumpida es lo que les impide, igual que a mí, ejercer la crítica sobre la propia vida, reconocer y sentir su estupidez y ligereza, su insignificancia horrorosamente ridícula, su tristeza y su irremediable vanidad”.

Hermann Hesse

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi familia, especialmente a mi madre por haber estado conmigo en todo momento, siempre brindarme lo mejor de sí y por darme ese buen ejemplo que me motiva a ser una mejor versión de mí mismo. A mi padre por apoyarme en todas mis decisiones y a mi hermana por cuidarme y estar pendiente de mí; a todos ustedes les agradezco por estar a mi lado y por todo este tiempo que compartimos juntos.

A mis amigos Ricardo, Estefany, Galo, Santiago por todos los momentos vividos y su comprensión; su presencia fue sinónimo de estabilidad y alegría en mi vida. Gracias porque fueron ustedes, principalmente, quienes supieron entenderme en estos difíciles años. A Henry, Francisco, Diego, Majo, Christopher, Víctor, Mile y Manu. A todos ustedes gracias por brindarme un pequeño espacio en su vida y haber vivido tantas anécdotas. Muchachos, me siento muy afortunado de haber coincidido en sus caminos.

Al grupo malaria, principalmente al Dr. Fabián Sáenz por haber confiado en mí, tener paciencia y transmitirme parte de su conocimiento. A Eileen, Andrea, Gaby, Juan Carlos, Elizabeth y Claudia por estar siempre dispuestos a ayudarme y enseñarme. A Silvi y Bibi que, a pesar de conocerlas hace poco tiempo, se han convertido en mis amigas y han hecho más agradable mi estancia en el laboratorio.

Agradezco al CISeAL, por poner a mi disposición todo lo necesario para la realización de este proyecto; y a la Dra. Simone Fréderique por instruirme y contribuir en la elaboración del mismo. Al Dr. John Adams de la Universidad de Florida del Sur, por proporcionar los materiales y reactivos necesarios para este estudio. A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y al TWAS por el financiamiento de esta investigación.

A todas esas personas que ya no están, pero compartieron conmigo un pequeño tramo de este camino, y a quienes hoy caminan junto a mí. Todos ustedes me han enseñado algo y me han hecho crecer. Gracias a todos porque llevaré una fracción de cada uno de ustedes; que eternamente formará parte de mí.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN 1
2. *ABSTRACT* 2
3. INTRODUCCIÓN 3
   3.1. Generalidades de la malaria 3
   3.2. Distribución mundial de la malaria 4
   3.3. Distribución de la malaria en Ecuador 4
   3.4. Diagnóstico y tratamiento 6
   3.5. *Anopheles*, el vector 7
   3.6. *Plasmodium vivax*, el causante de malaria 7
   3.7. Ciclo de vida 9
   3.8. Invasión de reticulocitos 10
   3.9. Proteínas de invasión 11
   3.10. Estudios de diversidad en América 13
   3.11. Objetivos 15
4. MATERIALES Y MÉTODOS 16
   4.1. Ética 16
   4.2. Obtención de muestras 16
   4.3. Extracción de ADN 16
   4.4. Amplificación de genes 17
      4.4.1. PCR del fragmento 19 del gen *P. vivax* Merozoite Surface Protein 1 (*Pvmsp1-19*) 17
      4.4.2. PCR de la región II del gen *P. vivax* Duffy Binding Protein (*PvdbpII*) 18
      4.4.3. PCR de la región II del gen *P. vivax* Reticulocyte Binding Protein 1a (*Pvrbp1a-2*) 18
      4.4.4. PCR del gen *P. vivax* Apical Membrane Antigen 1 (*Pvama1*) 19
   4.5. Purificación 20
   4.6. Secuenciación 20
   4.7. Ensamblaje y alineamiento de secuencias 20
   4.8. Análisis de datos 21
      4.8.1. Índices de variabilidad genética 21

4.8.2. Pruebas de Neutralidad 21
4.8.3. Análisis de diversidad y relación genética entre localidades ecuatorianas 22
4.8.4. Análisis de diversidad y relación genética entre distintos sitios geográficos 22
4.8.5. Análisis de los polimorfismos asociados a epítopos de células B en *PvdbpII* 23
4.8.6. Análisis de diversidad genética en los dominios de *Pvama1* 23
4.8.7. Representaciones tridimensionales de las estructuras proteicas 24
5. RESULTADOS 25
5.1. Muestras usadas en el estudio y asignación a localidades.....25
5.2. Análisis de polimorfismos en genes de invasión del merozoíto 25
5.2.1. Análisis del fragmento 19 del gen *P. vivax* Merozoite Surface Protein 1 (*Pvmsp1-19*) 25
5.2.2. Análisis de la región II del gen *P. vivax* Duffy Binding Protein (*PvdbpII*) 26
5.2.3. Análisis de la región II del gen *P. vivax* Reticulocyte Binding Protein 1a (*Pvrbp1a-2*) 26
5.2.4. Análisis del gen *P. vivax* Apical Membrane Antigen 1 (*Pvama1*) 27
5.3. Distribución de haplotipos según localidades 27
5.4. Relaciones genéticas entre haplotipos.....28
5.5. Comparación de la diversidad y diferenciación genética entre localidades..... 29
5.6. Comparación de la diversidad y diferenciación genética entre *P. vivax* ecuatorianos y poblaciones de distintos sitios geográficos 30
5.7. Selección natural en genes de invasión 31
5.8. Polimorfismos en epítopos de células B en *PvdbpII*.....32
5.9. Diversidad genética y selección natural dentro del gen *Pvama1* 32
6. DISCUSIÓN.....34
6.1. Diversidad de genes invasivos 35
6.1.1. Diversidad en *Pvmsp1-19* 35
6.1.2. Diversidad y selección natural en *PvdbpII* 36
6.1.3. Diversidad y selección natural en *Pvrbp1a-2* 38
6.1.4. Diversidad y selección natural en *Pvama1* 39

6.2. Diversidad y estructura poblacional de *P. vivax* en localidades ecuatorianas 41
6.3. Comparación de la diversidad y diferenciación genética entre poblaciones de *P. vivax* de distintos sitios geográficos 42
6.3.1. Diversidad y diferenciación genética entre poblaciones de *P. vivax* para el gen *PvdbpII* 42
6.3.2. Diversidad y diferenciación genética entre poblaciones de *P. vivax* para el gen *Pvama1* 44
7. CONCLUSIONES.....46
8. RECOMENDACIONES 47
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 48
10. FIGURAS 60
11. TABLAS.....73
12. ANEXOS 92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de muestras colectadas 60
Figura 2. Geles representativos de los productos amplificados.....61
Figura 3. Distribución geográfica de las localidades asignadas para el estudio..... 62
Figura 4. Alineamiento de *Pvmsp1-19* 63
Figura 5. Alineamiento de *PvdbpII* 63
Figura 6. Alineamiento de *Pvrbp1a-2* 64
Figura 7. Alineamiento de *Pvama1* 64
Figura 8. Frecuencias de haplotipos DBPII según localidades 65
Figura 9. Frecuencias de haplotipos RBP1a-2 según localidades 65
Figura 10. Frecuencias de haplotipos AMA1 según localidades 66
Figura 11. Red de haplotipos de *PvdbpII* 67
Figura 12. Red de haplotipos de *Pvrbp1a-2* 68
Figura 13. Red de haplotipos de *Pvama1* 69
Figura 14. Epítopos presentes en la región II de PvDBP 70
Figura 15. Ubicación de 28 residuos polimórficos presentes en la región II de la proteína PvDBP 70
Figura 16. Representación gráfica de la diversidad nucleotídica (π) a lo largo del gen *Pvama1* 71
Figura 17. Localización de los 26 residuos polimórficos en PvAMA1 72
Figura 18. Ubicación de la hendidura de unión del ligando hidrófobo en la proteína PvAMA1.....72

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Lista de primers utilizados para la amplificación y secuenciación de los cuatro genes involucrados en la invasión de reticulocitos.....73
Tabla 2. Comparación de la diversidad genética de los cuatro principales genes involucrados en la invasión de reticulocitos en *P. vivax* ecuatorianos.....74
Tabla 3. Haplotipos *PvdbpII* presentes en 50 muestras de *P. vivax* ecuatorianos.....75
Tabla 4. Haplotipos *Pvrbp1a-2* presentes en 70 muestras de *P. vivax* ecuatorianos.....78
Tabla 5. Haplotipos *Pvama1* presentes en 73 muestras de *P. vivax* ecuatorianos.....82
Tabla 6. Diversidad y diferenciación genética de *PvdbpII* entre localidades.....84
Tabla 7. Diversidad y diferenciación genética de *Pvrbp1a-2* entre localidades. 84
Tabla 8. Diversidad y diferenciación genética de *Pvama1* entre localidades. 85
Tabla 9. Estimación de la diversidad y diferenciación genética entre diversas poblaciones geográficas de *P. vivax* utilizando secuencias disponibles del gen *PvdbpII*. 86
Tabla 10. Estimación de la diversidad y diferenciación genética entre diversas poblaciones geográficas de *P. vivax* utilizando secuencias disponibles del gen *Pvama1* ... .87
Tabla 11. Pruebas de neutralidad para los genes involucrados en la invasión de reticulocitos. 88
Tabla 12. Análisis de polimorfismos y pruebas de neutralidad en epítopos de células B inhibitorias (previamente determinadas), pertenecientes a la región II del gen *P. vivax* Duffy Binding Protein (*PvdbpII)*, en muestras ecuatorianas.....89
Tabla 13. Estimación y comparación de la diversidad genética entre dominios de *Pvama1* en 73 muestras de *P. vivax* ecuatorianos 90
Tabla 14. Pruebas de neutralidad en cada dominio de *Pvama1* en 73 muestras de *P. vivax* ecuatorianos. 91

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Mapa de la distribución mundial de malaria en el año 2000 y 2016 92
Anexo 2. Mapa de la distribución de malaria en América en 2015 según el índice parasitario anual (API).....92
Anexo 3. Casos reportados de malaria en Ecuador entre el 2016 y 2017 93
Anexo 4. Mapa de la distribución mundial de *Plasmodium vivax* en 2010.....93
Anexo 5. Ciclo de vida de *Plasmodium vivax* 94
Anexo 6. Proceso de invasión de merozoitos en *P. vivax* 95
Anexo 7. Estructura esquemática de las proteínas invasivas y los fragmentos amplificados 96
Anexo 8. Representación del dominio homólogo de la proteína PfRh4, expresada por *P. falciparum,* involucrada en la unión eritrocítica.....96
Anexo 9. Consentimiento informado 97

1. RESUMEN

En Ecuador la malaria ha constituido un importante problema de salud pública a lo largo del tiempo. Sin embargo, en los últimos 15 años, el número de casos reportados se ha reducido, aproximadamente, un 99%; colocando al país en fase de pre eliminación. A pesar de esto, se registran varios brotes periódicos en las regiones endémicas, y a partir del 2015 los casos se han incrementado; perjudicando a los sectores más vulnerables de la población. Con el fin de aportar información sobre los parásitos circulantes en nuestro país y contribuir en la vigilancia epidemiológica de esta enfermedad, el presente estudio determinó la variabilidad de los principales genes codificantes de proteínas invasoras de reticulocitos y cómo la selección natural influye en su diversidad genética. Además, este estudio proporciona una idea sobre la diversidad de *P. vivax* encontrada en nuestro territorio en comparación a otros países endémicos. Un total de 91 muestras de *P. vivax* ecuatorianos provenientes de la Costa y Amazonía, colectadas entre el 2012 y 2015, fueron utilizadas para realizar los análisis de las secuencias nucleotídicas de cuatro genes implicados en el proceso de invasión de reticulocitos (*Pvmsp1-19*, *PvdbpII*, *Pvrbp1a-2* y *Pvama1*). Se examinó los polimorfismos genéticos y se realizaron redes de haplotipos para determinar las relaciones de los parásitos entre las localidades. Además, se estimó la diversidad genética, el grado de diferenciación; y la influencia de la selección natural. Los resultados revelaron que los niveles de diversidad son distintos en cada gen y, posiblemente, esta depende del rol que cumple la proteína en la invasión. *PvdbpII* y *Pvrbp1a-2* mostraron diversidad muy alta; mientras que en *Pvama1* fue moderada. Por el contrario, *Pvmsp1-19* demostró ser un fragmento conservado. Adicionalmente, se identificó mayor diversidad en las localidades pertenecientes a la Amazonía; y los haplotipos hallados en estas estaban más relacionados entre sí que con las variantes de la Costa. Por otra parte, se evidenció que la selección natural se comporta de manera distinta en cada gen y, a su vez esta actúa diferencialmente a través de estas proteínas. Finalmente, al comparar la diversidad de *PvdbpII* y *Pvama1* encontrada en *P. vivax* ecuatorianos con otros países endémicos, se observó que ésta era muy similar, incluso en territorios donde los niveles de transmisión son altos y continuos. Estos hallazgos contribuyen con el conocimiento que permitirá determinar la factibilidad del uso de estos genes como potenciales blancos para el desarrollo de una futura vacuna para la región y nuestro país.

Palabras clave: diversidad, genes de invasión, malaria, *Plasmodium vivax*, reticulocitos

2. ABSTRACT

Malaria has been a major public health problem over time in Ecuador. However, in the last 15 years the number of reported cases has decreased in approximately 99% and placed the country in malaria pre-elimination phase. Nevertheless, several periodic outbreaks occur in endemic regions of the country and, since 2015 the number of cases has increased, harming the most vulnerable population groups. In order to provide information about the circulating parasites in our country and contribute in epidemiological surveillance of this disease, the present study determined the variability of the main merozoite invasion genes, and how natural selection influences their genetic diversity. In addition, this study provides insights about the diversity of *P. vivax* found in our territory compared to other endemic countries. A total of 91 *P. vivax* samples from the Coast and Amazonian regions, collected during 2012-2015, were used to analyze the nucleotide sequences of four reticulocyte invasive genes (*Pvmsp1-19*, *PvdbpII*, *Pvrbp1a-2* y *Pvama1*). Gene polymorphisms were examined, and haplotype networks were developed to depict parasite relationships between locations. Moreover, genetic diversity, the degree of differentiation and the influence of natural selection were analyzed. The results revealed that diversity levels were different in each gene and, probably, depend on the role that each gene fulfills in the invasion process. *PvdbpII* and *Pvrbp1a-2* showed high diversity, while *Pvama1* had moderate diversity. Conversely, *Pvmsp1-19* was a conserved fragment. Additionally, greater diversity was identified in Amazonian locations; and the haplotypes found there were more related to each other than Coast´s variants. Also, it was evidenced that natural selection operates distinctly in each gene and acts differentially through these proteins. Finally, by comparing the diversity of *PvdbpII* and *Pvama1* found in Ecuadorian *P. vivax* to other endemic countries, it was observed that they were very similar, even in territories with high and continuous transmission. These findings contribute to the knowledge to determine the feasibility to use these genes as potential targets in future vaccine development for the region and the country.

Keywords: diversity, invasion genes, malaria, *Plasmodium vivax*, reticulocytes

3. INTRODUCCIÓN

3.1. GENERALIDADES DE LA MALARIA

La malaria o paludismo es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium* que se transmiten al ser humano mediante la picadura de mosquitos hembra infectados del género *Anopheles*. Existen cinco especies causantes de malaria en humanos: *Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium malarie, Plasmodium ovale* y *Plasmodium knowlesi*. De las cuales, *P. falciparum* y *P. vivax* son las especies más comunes y a las que se atribuye la mayor parte de la morbilidad y mortalidad (OMS, 2017).

Las infecciones con estos parásitos pueden resultar en una amplia variedad de síntomas. En algunos casos los síntomas pueden estar ausentes o ser muy leves, mientras que en otros pueden ser severos e incluso causar la muerte. Debido a esto, la malaria puede ser categorizada como: asintomática, no complicada o severa (complicada). El periodo de incubación del parásito, tras la picadura del mosquito, suele ser entre 7 y 15 días, dependiendo la especie. Se ha observado que los periodos de incubación más cortos, frecuentemente, son causados por *P. falciparum* y los más largos por *P. malarie* (CDC, 2017).

En el caso de la malaria no complicada los síntomas más comunes presentados por los pacientes son: fiebre, escalofríos, sudoración, dolor de cabeza y cuerpo, náusea y vómito. Estos suelen manifestarse cada dos o tres días, de acuerdo con la especie de *Plasmodium*. Por otro lado, la malaria severa ocurre cuando las infecciones provocan fallas graves en órganos, anomalías en la sangre o en el metabolismo del paciente. Las manifestaciones de la malaria complicada incluyen: malaria cerebral (conducta anormal, alteración de la conciencia, convulsiones u otras anomalías neurológicas), anemia severa, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), falla renal aguda entre otras (CDC, 2017).

Se estima que alrededor de 3200 millones de personas (casi la mitad de la población mundial) corren el riesgo de contraer esta enfermedad. La mayoría de los casos

y de las muertes se registran en África subsahariana, pero también se ven afectadas Asia Sudoriental, Latinoamérica y Oriente Medio (OMS, 2017).

A pesar de que entre el 2010 y 2015 la incidencia de la enfermedad y la tasa de mortalidad se redujeron en un 21% y 29% respectivamente a escala global, en el año 2016 se registraron 216 millones de casos de paludismo que ocasionaron la muerte de unas 445 000 personas. De estos, el 90% de los casos y el 91% de los fallecimientos correspondieron a la región de África Subsahariana, siendo los lactantes, niños menores de cinco años y mujeres embarazadas los más afectados (OMS, 2017).

3.2. DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DE LA MALARIA

El paludismo se encuentra distribuido en zonas tropicales y subtropicales del mundo; principalmente en África subsahariana, Asia Sudoriental, Oriente Medio y Latinoamérica. Según la Organización Mundial de la Salud, en el 2016, 91 países fueron considerados endémicos para esta enfermedad (Anexo 1).

En América, el paludismo es endémico en 21 países (Anexo 2). En Sudamérica se encuentra en: Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guyana, Paraguay, Perú, Surinam, Venezuela y Guyana Francesa. En Centro América: Belice, Honduras, Guatemala, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá y México. Y en el Caribe: República Dominicana y Haití (OMS, 2017).

A excepción de Haití y Venezuela, la mayoría de los países de esta región ha experimentado una disminución de casos reportados entre el año 2000 y 2015. Se estima que la morbilidad y mortalidad, en este periodo, se ha reducido en 62% y 61.2 % respectivamente. Además, en 2015, países como Argentina, Paraguay y Costa Rica no reportaron casos, y estarían próximos a iniciar un proceso de eliminación (OMS, 2017).

3.3. DISTRIBUCIÓN DE LA MALARIA EN ECUADOR

La malaria en Ecuador se distribuye en la Costa y Amazonía. Siendo *P. vivax* la especie que se encuentra con mayor frecuencia en la Amazonía, mientras que *P. falciparum* se localiza mayormente en la Costa y principalmente en la provincia de

Esmeraldas. En los últimos años el número de casos se ha reducido notablemente, de más de 100 000 (IPA=13.6) en el año 2000 a 558 (IPA=0.06) en el año 2015 (MSP, 2016). Lo que ha permitido que Ecuador sea considerado como un país en periodo de pre-eliminación según la Organización Mundial de la Salud en el año 2013.

Sin embargo, y a pesar de los esfuerzos realizados por las autoridades nacionales, en el 2016 se reportaron 917 casos. De este total, 633 fueron ocasionados por *P. vivax* (69.02%) principalmente en: Morona Santiago, Pastaza y Orellana, y 284 ocasionados por *P. falciparum* (30.98%) especialmente en la provincia de Esmeraldas (MSP, 2016). Estas cifras se incrementaron para el 2017, dado que se reportaron 1252 casos, 893 causados por *P. vivax* y 359 por *P. falciparum*. La mayoría de reportes por infecciones producidas por *P. vivax* se localizan, al igual que en el 2016, en la provincia de Morona Santiago. Asimismo, los reportes correspondientes a infecciones por *P. falciparum* pertenecen, en su mayoría, a Esmeraldas (MSP, 2017) (Anexo 3).

Pese a que existen reportes continuos de los casos producidos por *P. vivax* en el territorio nacional, muchos de estos datos podrían estar subestimados. Varios estudios han mostrado que en las áreas endémicas de malaria los casos asintomáticos y las infecciones sub microscópicas son muy comunes (Laishram, 2012; Bousema et al., 2014; Moreira et al., 2015). Esto se ve reflejado en el estudio realizado por Veloz-Haro y colaboradores en 2015 en cuatro poblaciones del Noroeste de Ecuador. Los resultados mostraron que la mayor cantidad de infecciones positivas (77,8%) fueron causadas por *P. vivax* y que el 97.3% de estas eran asintomáticas, lo que revela una alta prevalencia de malaria asintomática causada por esta especie en estas localidades. Esto es confirmado en el estudio de Sáenz et al. (2017) realizado en las mismas poblaciones en donde, a pesar de no encontrar parásitos por medio de microscopía, se detectó la presencia de *Plasmodium* por medio de PCR y reveló una prevalencia de 7,5% (6,9 % para *P. vivax* y 0,6% para *P. falciparum*). Resultados mucho más altos de los esperados, y comparables con reportes en áreas endémicas de países vecinos con niveles de transmisión más altos.

Generalmente el número de casos reportados a lo largo del tiempo tiene una estrecha relación con fenómenos naturales y cambio climático. Se ha demostrado que, en épocas con mayor cantidad de precipitaciones o en presencia del fenómeno de El Niño la

incidencia de malaria aumenta considerablemente, debido a que mejora las condiciones de desarrollo y propagación del vector (SNEM, 2014).

3.4. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

Los signos y síntomas clínicos que presenta la malaria muchas veces no permiten distinguir el paludismo de otras causas de enfermedad febril, por lo tanto, una confirmación parasitológica es indispensable. Existen tres métodos principales para detectar la presencia del parásito; el examen microscópico, las pruebas rápidas (RDTs) y los diagnósticos moleculares (PCR).

El examen microscópico es realizado mediante la observación de una gota gruesa o un frotis sanguíneo, previamente teñidos con Giemsa. Debido a su alta sensibilidad de detección (20 a 40 parásitos/µl de sangre), capacidad para identificar la especie de *Plasmodium* y estimar parasitemias; es considerada la más eficaz para el diagnóstico de malaria (OMS, 2017).

Las pruebas de diagnóstico rápido o RDTs se basan en la detección de antígenos específicos del parásito o en actividades enzimáticas asociadas con ellos. El método de detección del antígeno HRP-2 (Histidine Rich Protein-2) es el más usado para la identificar infecciones causadas por *P. falciparum*, sin embargo, existen otras pruebas que se encargan de detectar aldolasas específicas para *Plasmodium* (CDC, 2017). A pesar de que pueden ser fácilmente implementadas en zonas de difícil acceso, su sensibilidad de detección es muy baja (200 parásitos/µl de sangre) y pueden dar resultados no confiables (OMS, 2017).

Por otro lado, el diagnóstico molecular es una técnica confiable y muy sensible para detectar al parásito en la sangre humana. Este método se basa en la extracción de ADN del parásito, presente en la sangre del paciente; para luego ser sometido a un proceso de amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando oligonucleótidos específicos para la identificación de la especie de *Plasmodium*. Pese a que su sensibilidad es muy alta (1 parásito/µl de sangre), el costo de implementación de esta técnica es un limitante (Montoya et al., 2008).

La OMS recomienda, antes de administrar el tratamiento, la confirmación del diagnóstico con métodos parasitológicos; ya sean pruebas de microscopía o de diagnóstico rápido. En nuestro país, el tratamiento sugerido por esta organización en el caso de malaria no complicada por *P. falciparum* es de arteméter-lumefantrina (AL) más primaquina (PQ); y quinina (QN) en casos severos o complicados. En el caso de infecciones provocadas por *P. vivax* se recomienda el uso de cloroquina (CQ) durante los primeros tres días y, posteriormente, primaquina (PQ) durante siete días. El diagnóstico y el tratamiento tempranos del paludismo atenúan la incidencia de la enfermedad, reducen sus efectos mortales y contribuyen a prevenir su transmisión (OMS, 2017).

3.5. *ANOPHELES*, EL VECTOR

La malaria se transmite, en la mayoría de los casos, por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles*. Estos dípteros atraviesan por cuatro estados en su ciclo de vida: huevo, larva, pupa y adulto. Los primeros tres estadios son acuáticos y poseen una duración de 5 a 14 días, dependiendo la especie y la temperatura del ambiente. Mientras que en el estadio adulto las hembras pueden vivir alrededor de un mes (o más en condiciones de laboratorio); sin embargo, es probable que no vivan más de 1 ó 2 semanas en estado natural (CDC, 2017).

En el mundo hay más de 400 especies de *Anopheles*, pero solo alrededor de 40 son consideradas vectores de la malaria. Los anofelinos están presentes en todo el mundo, a excepción de Antártida; y la distribución de estas especies depende de las condiciones ambientales de cada región (OMS, 2017; CDC, 2017). El vector considerado más eficiente en la transmisión de paludismo en todo el mundo; y el principal en la zona de África Subsahariana es *Anopheles gambiae.* Mientras que los principales vectores en América son: *An. darlingi*, *An. aquasalis*, *An. albitarsis* y *An. pseudopunctipennis* (Sinka et al., 2012).

3.6. *PLASMODIUM VIVAX*, EL CAUSANTE DE MALARIA

Plasmodium vivax es la principal especie causante de malaria en Oriente Medio, Asia, el Oeste del Pacífico, Centro y Sur América (OMS, 2017) (Anexo 4). Se desconoce con exactitud el número de casos de infecciones producidas por este parásito, sin

embargo, se estima que en el año 2015 existieron aproximadamente 13.8 millones en todo el mundo (OMS, 2017). En América, la población en riesgo de paludismo supera los 120 millones en más de 21 países, y las infecciones por *P. vivax* representan más del 70% de los casos notificados (OMS, 2017).

P. vivax es un parásito intracelular con la capacidad de invadir células eritrocíticas humanas, pertenece al reino Protista, filo Apicomplexa, clase Aconoidasida, orden Haemosporida y familia Plasmodiidae. Este filo de parásitos se caracteriza por la presencia de una estructura subcelular llamada complejo apical, el cual puede variar dependiendo de la clase. *Plasmodium* posee un complejo apical compuesto por anillo polar, micronemas, roptrias, gránulos densos y microtúbulos. Este conjunto de organelos constituye un elemento fundamental e indispensable en el proceso de infección de estos organismos (Morrissette & Sibley 2002).

Esta especie se distingue morfológicamente de las demás por la presencia de pequeños puntos oscuros en el citoplasma del reticulocito (glóbulo rojo inmaduro), conocidos como los gránulos de Schüffner, los cuales representan a caveolas (complejos de vesículas de origen parasitario exportadas al citoplasma de la célula infectada) (Aikawa et al., 1975; Udagama et al., 1988). Otra característica que lo diferencia es la forma redonda de su estadio sexual, similar a la de sus estadios asexuales. Sin embargo, no cabe duda de que uno de los rasgos más importantes dentro de esta especie es la capacidad para desarrollar etapas hepáticas de larga duración, los hipnozoítos (Krotoski et al., 1982).

Por otra parte, *P. vivax* se caracteriza por invadir, principalmente, reticulocitos (glóbulos rojos jóvenes). Se ha reportado que interacciones específicas entre los ligandos DBP (Duffy Binding Protein) del parásito y los receptores DARC (Duffy Antigen Chemokine Receptor), pertenecientes a los glóbulos rojos, son esenciales para mediar este proceso y, por ende, individuos que carecen de este receptor (Duffy negativos) son resistentes a infecciones con *P. vivax* (Michon et al., 2000; Cavasini et al., 2007; Grimberg et al., 2007; Chitnis, C. E., & Sharma, A., 2008). No obstante, varios reportes recientes a nivel mundial muestran infecciones con *P. vivax* en individuos Duffy negativos, lo que sugiere que el parásito es capaz de utilizar rutas de invasión celular alternativas (Ménard et al., 2010; Carvalho et al., 2012; Woldearegai et al., 2013).

3.7. CICLO DE VIDA

El ciclo de vida de *P. vivax* incluye dos hospederos: mosquitos hembra *Anopheles* y humanos. En los humanos (hospedero intermediario) ocurre la reproducción asexual; mientras que la reproducción sexual tiene lugar en el mosquito (hospedero definitivo) (Schmidt & Roberts, 2000) (Anexo 5).

En humanos, el ciclo de vida inicia cuando un mosquito infectado inyecta saliva con esporozoítos dentro del torrente sanguíneo. Los esporozoítos infectan las células del hígado y se multiplican (ciclo exo-eritrocítico). Allí permanecen aproximadamente siete días produciendo un gran número de merozoítos, los cuales se agrupan en estructuras llamadas esquizontes. Algunos de estos esporozoítos pueden entrar en un estado de latencia en el hígado llamado hipnozoíto, el cual puede permanecer en dormancia incluso años después de la infección. Una vez que los esquizontes han llegado a su madurez, liberan merozoítos a la circulación, los cuales invaden, principalmente, reticulocitos (ciclo eritrocítico). Posteriormente, los merozoítos se desarrollan dentro del reticulocito y toman una forma anillada denominada trofozoíto. Estas estructuras pueden madurar en esquizontes y luego liberar más merozoítos para invadir nuevos glóbulos rojos o diferenciarse en gametocitos (CDC, 2017).

Los mosquitos, al momento de alimentarse, ingieren gametocitos masculinos (microgametocitos) y femeninos (macrogametocitos), lo que le permite al parásito continuar con su multiplicación dentro del insecto (ciclo esporogónico). En el estómago, los microgametos penetran los macrogametos, en el proceso de fertilización, y dan paso a la formación de cigotos. El cigoto toma una forma elongada y motil, llamada ooquinete, el cual es capaz de atravesar el epitelio del intestino medio del mosquito para desarrollarse en un ooquiste. Una vez que el ooquiste ha madurado, libera esporozoítos que migran hacia las glándulas salivales. Allí, el mosquito es capaz de infectar, nuevamente, a otro ser humano al momento de alimentarse, y así, continuar con el ciclo de vida del parásito (CDC, 2017).

3.8. INVASIÓN DE RETICULOCITOS

La invasión de los reticulocitos inicia cuando los esquizontes, previamente desarrollados en las células hepáticas, liberan merozoítos en el torrente sanguíneo. Los merozoítos libres invaden los glóbulos rojos en un proceso rápido, dinámico y de varios pasos incluyendo: contacto inicial, reorientación, unión irreversible, invasión y sellado de la membrana (Weiss et al., 2015) (Anexo 6).

El contacto inicial de los merozoítos con los reticulocitos es un proceso escasamente comprendido, y poco se sabe sobre los detalles moleculares que ocurren en él. Sin embargo, se cree que esta unión primaria es llevada a cabo por la proteína MSP1 (Merozoite Surface Protein 1), la cual es la más abundante en la superficie del parásito (Gilson et al., 2006). Además, se ha visto que MSP1 actúa como una plataforma sobre la superficie del merozoito, a la cual se adhieren proteínas extrínsecas que, de la misma manera, intervienen en la unión con los reticulocitos (Lin et al., 2016).

En el segundo paso de invasión, los merozoítos orientan su extremo apical hacia el reticulocito, proceso que involucra, principalmente, a los ligandos DBP (Duffy Binding Protein) y RBP1a (Reticulocyte Binding Protein 1a). Las proteínas DBP y RBP1a, previamente sintetizadas en los micronemas, son llevadas a la superficie en el momento de la invasión. Una vez ahí, el ligando DBP se une a su receptor DARC (Duffy Antigen Chemokine Receptor); y RBP1a a un receptor aún desconocido en la superficie del reticulocito, para reorientar al parásito (Galinski et al., 1992; Chitnis & Sharma, 2008).

En el tercer paso de invasión, el merozoíto forma una unión fuerte e irreversible con el reticulocito por medio de la proteína AMA1 (Apical Membrane Antigen 1). AMA1 es producida en los micronemas, y es procesada en un fragmento de menor tamaño antes de ser transportada a la superficie del merozoíto en la etapa de invasión (Narum & Thomas, 1994). Una vez que la proteína se encuentra en la superficie se une a su receptor RON2, el cual fue previamente sintetizado en las roptrias del mismo merozoíto; y luego trasladado e insertado en la superficie de los reticulocitos para cumplir la función de auto-anclaje (Besteiro et al., 2011; Lamarque et al., 2011).

Una vez formada la unión irreversible, ciertos factores activan un motor de actina-miosina en la superficie del merozoíto, desde el extremo anterior hacia el extremo posterior del parásito, para que este pueda ser impulsado e ingrese dentro del reticulocito. Simultáneamente, contenidos ricos en lípidos son liberados desde las roptrias para dar forma a una vacuola parasitófora a medida que el parásito se abre camino dentro del eritrocito joven (Aikawa et al., 1978; Riglar et al., 2011).

Finalmente, se produce el sellamiento de las membranas en el extremo posterior del merozoíto, envolviendo al parásito dentro de la vacuola y el reticulocito. Todo este proceso puede completarse en aproximadamente 2 minutos y, luego de 48 horas, el esquizonte puede liberar entre 16 a 32 merozoítos capaces de invadir nuevos reticulocitos (Dvorin et al., 2010).

3.9. PROTEÍNAS DE INVASIÓN

MSP1 (PROTEÍNA DE SUPERFICIE DEL MEROZOÍTO 1)

MSP1 es una proteína codificada por el gen *Pvmsp1*, localizado en el cromosoma 7 (Anexo 7). Esta proteína es altamente conservada entre las especies de *Plasmodium*, es la más abundante en la superficie del merozoíto, y la encargada del anclaje inicial a los reticulocitos (Gilson et al., 2006). MSP1 es sintetizada como una proteína de 200 kDa, que atraviesa por un proceso proteolítico para formar cuatro fragmentos polipeptídicos (83 kDa, 30 kDa, 38 y 42 kDa) antes del egreso de los merozoítos desde los esquizontes (Stafford et al., 1996; Trucco et al., 2001; Pachebat et al., 2007).

Durante la invasión, el fragmento $MSP1_{42}$ es procesado en dos fragmentos más pequeños de 33 kDa y 19 kDa ($MSP1_{33}$ y $MSP1_{19}$). Finalmente, $MSP1_{33}$ es liberado en el torrente sanguíneo y solamente el fragmento $MSP1_{19}$ (codificado por el gen *Pvmsp1-19*) permanece en la superficie del merozoíto y es transportado dentro del reticulocito invadido (Blackman et al., 1990; Blackman & Holder, 1992). $MSP1_{19}$ corresponde a un fragmento altamente conservado y, estudios han demostrado que es altamente inmunogénico (Sachdeva et al., 2004; Fernandez-Becerra et al., 2010). Además, se ha visto que anticuerpos en contra de $MSP1_{19}$ pueden inhibir el crecimiento del parásito en

condiciones *in vitro*, por lo tanto, estarían asociadas a la protección inmune de infecciones con malaria (Egan et al., 1999; Jonh et al., 2004; Okech et al., 2004).

DBP (PROTEÍNA DE UNIÓN AL RECEPTOR DUFFY)

La proteína DBP es codificada por el gen *Pvdbp*, localizado en el cromosoma 6 (Anexo 7). Esta ha sido ampliamente involucrada en la unión y reorientación del merozoíto en el proceso invasivo. Este ligando, cuyo peso molecular se aproxima a 140 kDa, es sintetizado en los micronemas, y transportado a la superficie del parásito en el momento de la invasión. Está compuesto por siete dominios o regiones. El segundo dominio (DBPII), compuesto por 170 amino ácidos y comprendido entre los residuos 291 y 460, es el sitio de unión al receptor DARC en la superficie de los reticulocitos (Adams et al., 1990; Adams et al., 1992; VanBuskirk et al., 2004; Singh et al., 2006).

Se ha evidenciado que la región II (DBPII) genera anticuerpos inhibidores de unión y, bloquea la entrada del parásito en los eritrocitos en condiciones *in vitro* (Singh, Puri & Chitins, 2002). En humanos, los anticuerpos inhibidores de unión naturalmente adquiridos en contra de DBPII han sido asociados con reducción del riesgo de contraer infecciones con *P. vivax*, parasitemias bajas después de la infección y disminución del riesgo de presentar malaria clínica (King et al., 2008; Nicolete et al., 2016).

RBP1a (PROTEÍNA DE UNIÓN AL RETICULOCITO 1a)

RBP1a es un ligando codificado por el gen *Pvrbp1a*, ubicado en el cromosoma 7 (Anexo 7). Está involucrado en la unión y reorientación del merozoíto; sin embargo, se ha visto que también cumple un papel importante en el reconocimiento y selección de reticulocitos. Es una proteína de alto peso molecular, aproximadamente 326 kDa, y es expresada en los micronemas (Galinski et al., 1992; Han et al., 2016). Poco se sabe del dominio de unión con los reticulocitos, y menos aún de su receptor. No obstante, un estudio reciente propone que el sitio de unión específico se encuentra entre los aminoácidos 361 y 599 debido a que corresponde a un dominio homólogo de la proteína PfRh4, expresada por *P. falciparum,* involucrada en la unión eritrocítica (Han et al., 2016) (Anexo 8).

AMA1 (ANTÍGENO DE LA MEMBRANA APICAL 1)

La proteína AMA1 es codificada por el gen *Pvama1*, el cual está situado en el cromosoma 9 (Anexo 7). Se encarga de generar la unión sólida e irreversible con el reticulocito para facilitar el ingreso del parásito. Esta proteína de 88 kDa es producida en los micronemas, y es procesada proteolíticamente en un fragmento de 66 kDa antes de ser transportada a la superficie del merozoíto (Narum & Thomas, 1994). La región ecto-citoplasmática de AMA1 está conformada por tres dominios y 16 residuos de cisteína (Gunasekera et al., 2007). Análisis de la estructura de este ligando han determinado que los dominios I y II poseen un motivo específico, el cual estaría implicado en la unión a los receptores en los eritrocitos inmaduros (Pizarro et al., 2005). Además, esta región ecto-plasmática es altamente inmunogénica y se ha visto que, en *P. falciparm*, induce la liberación de anticuerpos que inhiben la invasión de forma *in vitro* (Kocken et al., 2002; Múfalo et al., 2008; Dias et al., 2011)

3.10. ESTUDIOS DE DIVERSIDAD EN AMÉRICA

En América, la información disponible sobre la diversidad de genes invasores de los merozoítos es escasa, y esta se limita al estudio de un gen en particular. En Colombia, un estudio realizado por Ampudia y colaboradores en 1996 analizó la región II del gen *Pvdbp*; encontrando una alta diversidad en parásitos colombianos. De igual forma, De Sousa et al. (2011) confirman la alta diversidad de *PvdbpII* en seis distintos sitios geográficos de Brasil e indican que la recombinación juega un importante papel en el mantenimiento de ésta. Por otra parte, en 2008 el estudio de Ord y colaboradores realizó una comparación entre la diversidad genética de *ama 1* en *P. falciparum* y *P. vivax* provenientes de distintas áreas endémicas en Venezuela. Los hallazgos determinaron una mayor diversidad para *P. vivax,* así como la presencia de selección balanceadora en el dominio I. Únicamente el estudio llevado a cabo por González-Cerón et al. (2015), en parásitos provenientes del sur de México, agrupa los principales genes involucrados en el proceso invasivo (*Pvmsp1-42*, *PvdbpII* y *Pvama1*); examinando las diferencias en su diversidad y la influencia de la selección en cada uno de ellos. Estudios sobre la diversidad de estos genes, su distribución en los países endémicos, así como la influencia de las fuerzas evolutivas en la generación y mantenimiento de esta variabilidad genética son necesarios para proveer información importante que permita entender la estructura

poblacional de estos antígenos candidatos a vacunas; y al mismo tiempo contribuir con la vigilancia epidemiológica en la región.

El presente estudio busca determinar la variabilidad de los principales genes codificantes de proteínas invasoras de los merozoítos y cómo la selección natural influye en su diversidad genética. Asimismo, cómo esta diversidad determina la estructura y dinámica poblacional de los parásitos presentes en Ecuador. Esta investigación proporciona un enfoque distinto sobre la situación de los parásitos que circulan en nuestro país y aporta información sobre la diversidad de genes invasivos de *P. vivax* presentes en esta región. Además, contribuye con el conocimiento que permitirá determinar la factibilidad del uso de estos ligandos como potenciales blancos para el desarrollo de una futura vacuna para la región y en nuestro país.

3.11. OBJETIVOS

3.11.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la diversidad de los cuatro principales genes (*Pvmsp1-19*, *PvdbpII*, *Pvrbp1a-2* y *Pvama1*) involucrados en la invasión de reticulocitos en *Plasmodium vivax* ecuatorianos.

3.11.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar la presencia de mutaciones, mediante secuenciación, en los genes *Pvmsp1-19, PvdbpII, Pvrbp1a-2* y *Pvama1* en muestras de *Plasmodium vivax* ecuatorianos.

- Determinar la localidad en donde se concentra la mayor diversidad genética de *P. vivax* en Ecuador.

- Determinar si existe influencia de selección natural sobre los genes invasivos de *P. vivax.*

- Comparar la diversidad y diferenciación genética entre las poblaciones de *P. vivax* ecuatorianos y poblaciones de distintos países endémicos de malaria.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ÉTICA

Todos los procedimientos realizados en este trabajo fueron previamente aprobados por el Comité de Ética de Investigación de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Los pacientes que participaron en el presente estudio firmaron un consentimiento informado (Anexo 9).

4.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de sangre fueron colectadas en papel filtro Whatman, 3MM o 1MM, por personal del SNEM (Servicio Nacional para el Control de las Enfermedades Transmitidas por Vectores). La presencia e identificación de la especie del parásito fue confirmada por microscopía y posteriormente, las muestras fueron enviadas a las instalaciones del CISeAL, siguiendo los protocolos de transporte de sustancias biopeligrosas. Una vez que las muestras fueron registradas en el laboratorio, se confirmó la presencia del parásito por medio de PCR anidada y, finalmente, fueron almacenadas para su posterior análisis. Se analizaron 91 muestras provenientes de la Región Costa (N=27) y de la Región Amazónica (N=64) que fueron reportadas como casos positivos para *Plasmodium vivax* entre el 2012 y 2015 (Figura 1).

4.3. EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN de *Plasmodium vivax* se obtuvo a partir de muestras fijadas en papel filtro Whatman por medio de QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN Sample & Assay Technologies. Germantown, MD, USA). El procedimiento de extracción se realizó siguiendo el protocolo descrito a continuación:

Las muestras de sangre contenidas en el papel filtro fueron cortadas en pedazos pequeños, se las colocó en tubos de 1,5 ml y se añadieron 180 µl de buffer ATL; para ser incubadas a 85 °C por 10 min. Transcurrido el tiempo, se adicionaron 20 µl de solución proteinasa K, se mezcló con vórtex y se las incubó a 56 °C durante 1 hora.

Posteriormente, se agregaron 200 µl de buffer AL, se mezcló inmediatamente con ayuda del vórtex y se incubó a 70 °C durante 10 min. Luego se adicionaron 200 µl de etanol al 100% y se trasvasó cuidadosamente la muestra a un tubo de 2 ml con columna, para ser centrifugada a 8000 rpm por 1 min. A continuación, se descartó el líquido filtrado, se añadieron 500 µl de buffer AW1 y, nuevamente se centrifugó a 8000 rpm por 1 min. Una vez más se descartó el líquido filtrado y se transfirió la columna a un nuevo tubo de 2 ml, donde se agregaron 500 µl de buffer AW2 para ser centrifugada a 14000 rpm por 3 min. En seguida; se desechó el pellet filtrado, se centrifugó a 14000 rpm por 1 min y se desechó, nuevamente, el precipitado.

Finalmente, se colocó la columna en un nuevo tubo de 1,5 ml, se añadieron 150 µl de buffer AE, se incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min. Por último, el ADN obtenido fue almacenado en alícuotas de 50 µl a -20 ºC para su posterior uso.

4.4. AMPLIFICACIÓN DE GENES

4.4.1. PCR DEL FRAGMENTO 19 DEL GEN *P. VIVAX* MEROZOITE SURFACE PROTEIN 1 (*PVMSP1-19)*

La amplificación de *Pvmsp1-19* se realizó mediante PCR simple, empleando los oligonucleótidos forward (*Pvmsp1-19F*) y reverse (*Pvmsp1-19R*) (Tabla 1). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 37,5 µl para cada reacción, que contenía 18,75 µl de GoTaq Colorless Mastermix (2X) (Promega, Madison, WI, USA), 3,75 µl de $MgCl_2$ (25 mM) (Promega, Madison, WI, USA), 1,5 µl de cada oligonucleótido (10 µM), 9 µl de H_2O ultra pura y 3 µl de ADN.

La reacción de amplificación se realizó mediante el siguiente perfil térmico: denaturación inicial a 94 ºC por 2 minutos; 35 ciclos a 94 ºC por 30 segundos, 62 ºC por 30 segundos y 72 ºC por 90 segundos; seguido de una extensión final a 72 ºC por 5 minutos.

4.4.2. PCR DE LA REGIÓN II DEL GEN *P. VIVAX* DUFFY BINDING PROTEIN (*PVDBPII*)

La amplificación de *PvdbpII* se realizó mediante PCR simple, empleando los oligonucleótidos forward (*PvdbpIIF*) y reverse (*PvdbpIIR*) (González-Cerón et al., 2015) (Tabla 1). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 37,5 µl para cada reacción, que contenía 18,75 µl de GoTaq Colorless Mastermix (2X) (Promega, Madison, WI, USA), 3,75 µl de $MgCl_2$ (25 mM) (Promega, Madison, WI, USA), 1,5 µl de cada oligonucleótido (10 uM), 9 µl de H_2O ultra pura y 3 µl de ADN.

La reacción de amplificación se realizó mediante el siguiente perfil térmico: denaturación inicial a 94 ºC por 2 minutos; 35 ciclos a 94 ºC por 30 segundos, 62 ºC por 30 segundos y 72 ºC por 90 segundos; seguido de una extensión final a 72 ºC por 5 minutos.

4.4.3. PCR DE LA REGIÓN II DEL GEN *P. VIVAX* RETICULOCYTE BINDING PROTEIN 1A (*PVRBP1A-2*)

La amplificación de *Pvrbp1a-2* se realizó mediante PCR simple, empleando los oligonucleótidos forward (*Pvrbp1a-2F*) y reverse (*Pvrbp1a-2R*) (Tabla 1). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 37,5 µl para cada reacción, que contenía 18,75 µl de GoTaq Colorless Mastermix (2X) (Promega, Madison, WI, USA), 3,75 µl de $MgCl_2$ (25 mM) (Promega, Madison, WI, USA), 1,5 µl de cada oligonucleótido (10 µM), 9 µl de H_2O ultra pura y 3 µl de ADN.

La reacción de amplificación se realizó mediante el siguiente perfil térmico: denaturación inicial a 94 ºC por 2 minutos; 35 ciclos a 94 ºC por 30 segundos, 54,7 ºC por 30 segundos y 72 ºC por 90 segundos; seguido de una extensión final a 72 ºC por 5 minutos.

4.4.4. PCR DEL GEN *P. VIVAX* APICAL MEMBRANE ANTIGEN 1 (*PVAMA1*)

La amplificación de *Pvama1* se realizó mediante PCR anidada, empleando los oligonucleótidos forward (*Pvama1_F16*) y reverse (*Pvama1_R613*) para la PCR 1 y, los oligonucleótidos forward (*Pvama1_F29*) y reverse (*Pvama1_R598*) para la PCR 2 (Ord, Tami & Sutherland, 2008) (Tabla 1).

La reacción de PCR 1 se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl para cada reacción, que contenía 12,5 µl de GoTaq Colorless Mastermix (2X) (Promega, Madison, WI, USA), 2,5 µl de $MgCl_2$ (25 mM) (Promega, Madison, WI, USA), 1 µl de cada oligonucleótido (10 µM), 6 µl de H_2O ultra pura y 2 µl de ADN. Mientras que, en la PCR 2, la reacción se hizo en un volumen final de 37,5 µl para cada reacción, que contenía 18,75 µl de GoTaq Colorless Mastermix (2X) (Promega, Madison, WI, USA), 3,75 µl de $MgCl_2$ (25 mM) (Promega, Madison, WI, USA), 1,5 µl de cada oligonucleótido (10 µM), 9 µl de H_2O ultra pura y 3 µl de ADN.

El perfil térmico utilizado en la primera reacción (PCR 1) fue el siguiente: denaturación inicial a 94 ºC por 3 minutos; 40 ciclos a 94 ºC por 1 minuto, 46 ºC por 1 minuto y 72 ºC por 2.5 minutos; seguido de una extensión final a 72 ºC por 10 minutos. Mientras que el perfil térmico de la segunda reacción (PCR 2) constó de: denaturación inicial a 94 ºC por 3 minutos; 40 ciclos a 94 ºC por 1 minuto, 57 ºC por 1 minuto y 72 ºC por 2.5 minutos; seguido de una extensión final a 72 ºC por 10 minutos (Ord, Tami & Sutherland, 2008).

La verificación de los productos amplificados por PCR se realizó por medio de la técnica de electroforesis convencional. Los amplicones obtenidos migraron en geles de agarosa al 2 % con buffer TBE 1X. Estos fueron observados en un transiluminador digital BioDoc-It ™ de luz ultra violeta (UVP inc.) y el tamaño de las bandas fue comparado con una escalera de referencia de 1500 pb (Promega, Madison, WI, USA). Las imágenes obtenidas con el transiluminador fueron editadas en el software Adobe Photoshop CS3 v10.0 (Figura 2).

4.5. PURIFICACIÓN

La purificación de los productos amplificados se realizó mediante illustra ExoProStar Enzymatic PCR and Sequencing Clean-up kit (GE Healthcare Life Sciences. Buckinghamshire, UK), siguiendo el protocolo descrito a continuación:

Se elaboró una solución con 2,5 µl de exonucleasa, 25 µl de fosfatasa alcalina y 472,5 µl de H_2O ultra pura, para un volumen final de 500 µl. A continuación, se colocó 5 µl de la preparación en cada una de las muestras; se procedió a incubarlas a 37 ºC por 25 minutos y, posteriormente, a 80 ºC por 20 minutos.

4.6. SECUENCIACIÓN

La secuenciación de *Pvmsp1-19*, *PvdbpII* y *Pvrbp1a-2* se realizó en ambas direcciones (forward y reverse), usando los mismos oligonucleótidos previamente utilizados en sus respectivas PCR. Mientras que para *Pvama1*, debido a su extenso tamaño, se utilizaron tres oligonucleótidos forward (*Pvama1_F142*, *Pvama1_F301* y *Pvama1_F441*) y tres oligonucleótidos reverse (*Pvama1_R138*, *Pvama1_R293* y *Pvama1_R442*) (Tabla 1), distintos a los utilizados en la PCR anidada (Ord, Tami & Sutherland, 2008).

La secuenciación fue realizada por electroforesis capilar, mediante el equipo Applied Biosystems 3130xl Genetic Analizer. Este procedimiento fue realizado por el proveedor comercial Macrogen, en Corea del Sur.

4.7. ENSAMBLAJE Y ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS

Cada muestra, con su respectiva secuencia forward y reverse, pasó por un proceso de ensamblaje para formar una secuencia consenso, la cual permitió obtener un fragmento de ADN de mayor calidad y reducir ambigüedades. Posteriormente, las secuencias consenso fueron alineadas y comparadas con la secuencia de referencia perteneciente a la cepa estándar Salvador-1 (SAL-1). Para *Pvmsp1-19*, PVX_099980 (PlasmoDB); para *PvdbpII*, PVX_110810 (PlasmoDB); para *Pvrbp1a-2*, AY501884 (GenBank) y para *Pvama1*, PVX_092275 (PlasmoDB). Las muestras, cuyas secuencias tenían una calidad

muy baja o estaban incompletas, fueron descartadas. El ensamblaje, alineamiento y edición de todas las secuencias fue realizado en el software Geneious v10.1.3.

4.8. ANÁLISIS DE DATOS

4.8.1. ÍNDICES DE VARIABILIDAD GENÉTICA

Los índices de diversidad genética como: número de sitios polimórficos (S), sitios únicos (Si), sitios parsimónicos (Pa), número promedio de diferencias entre nucleótidos (K), número de haplotipos (H), diversidad de haplotipos (Hd), número promedio de diferencias de nucleótidos por sitio entre dos secuencias o diversidad nucleotídica (π), y sus correspondientes desviaciones estándar (SD) fueron calculados en el software DnaSP v5.1 (Librado & Rozas, 2009).

4.8.2. PRUEBAS DE NEUTRALIDAD

Para probar la teoría neutral de evolución, se realizaron pruebas de Tajima´s D, Fu & Li´s D* y F* y McDonald-Kreitman. El estadístico de Fu & Li´s D* se basa en las diferencias entre el número de sitios únicos (Si) y el número total de mutaciones; mientras que Fu & Li´s F* compara las diferencias entre el número de sitios únicos (Si) y el número promedio de diferencias entre nucleótidos (K). La prueba de Tajima´s D, por su parte, se basa en las diferencias entre el número de sitios polimórficos (S) y número promedio de diferencias entre nucleótidos (K). Los resultados positivos o negativos de estas pruebas, que sean significativos, rechazan la hipótesis de la teoría neutral y, por ende, sugieren la influencia de la selección natural (Librado & Rozas, 2009).

Adicionalmente, se realizó la prueba de McDonald-Kreitman, la cual es capaz de determinar con mayor certeza una posible desviación de la neutralidad. Esta se basa en la comparación de la variación de las sustituciones sinónimas y no sinónimas dentro y entre especies. Bajo neutralidad, la proporción de variación no sinónima con respecto a la sinónima dentro de una especie va a ser igual a la proporción de variación no sinónima a sinónima entre las especies. Sin embargo, sí esta proporción es distinta y significativa indicaría la presencia de selección natural. En consecuencia, para este estadístico se utilizó a *Plasmodium knowlesi* como grupo externo. Para comparar a *PvdbpII* se empleó

el gen *P. knowlesi α* (L1480); mientras que para *Pvama1*, se usó el gen *P. knowlesi apical merozoite antigen 1* (AF298218). Estos análisis fueron realizados en el software DnaSP v5.1 (Librado & Rozas, 2009).

4.8.3. ANÁLISIS DE DIVERSIDAD Y RELACIÓN GENÉTICA ENTRE LOCALIDADES ECUATORIANAS

Para explorar la relación genética entre los haplotipos y como estos se distribuyen según las localidades, se construyó una red de haplotipos con los genes *PvdbpII*, *Pvrbp1a-2* y *Pvama1*. Se aplicó el algoritmo Median Joining para establecer las conexiones entre los haplotipos, para lo cual se utilizó el software NETWORK v5.0.0.1.

Para determinar el grado de diferenciación genética de las poblaciones de *P. vivax* entre localidades, se calculó el índice de fijación de Wright (F_{ST}) para los genes *PvdbpII*, *Pvrbp1a-2* y *Pvama1*. Los análisis respectivos fueron realizados por medio del software Arlequin v3.5.2.2.

4.8.4. ANÁLISIS DE DIVERSIDAD Y RELACIÓN GENÉTICA ENTRE DISTINTOS SITIOS GEOGRÁFICOS

Se calculó el índice de fijación de Wright (F_{ST}) para los genes *PvdbpII* y *Pvama1*, y así, determinar el grado de diferenciación genética de las poblaciones de *P. vivax* ecuatorianos con respecto a poblaciones de parásitos procedentes de distintos sitios geográficos. Los valores de F_{ST} fueron estimados a través del software Arlequin v3.5.2.2.

Para *PvdbpII* se empleó un total de 688 secuencias provenientes de: Ecuador, n=50; Brasil, n=122 (EU812839-EU812960); Colombia, n=17 (U50575-U50591); India, n=100 (FJ491142-FJ49124); Irán, n=19 (EU860428-EU860438, KF318358-KF318359 y KF791921-KF791926); Corea del Sur, n=15 (JN989472-JN989484 y AF215737-AF215738); México, n=35 (KP759780-KP759814); Papúa Nueva Guinea, n=200 (AF289480-AF291096, AY970837-AY970925 y AF469515-AF469602); Sri Lanka, n=100 (GU143914-GU144013) y Tailandia, n=30 (EF219451-EF379135).

Para *Pvama1* se utilizó un total de 510 secuencias provenientes de: Ecuador, n=73; India, n=8 (EF025187-EF025197); Papúa Nueva Guinea, n=102 (KC702402-KC702503); Sri Lanka, n=23 (EF218679-EF218701); Tailandia, n=231 (FJ784891-FJ785121) y Venezuela, n=73 (EU346015-EU346087).

4.8.5. ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS ASOCIADOS A EPITOPOS DE CÉLULAS B EN *PVDBPII*

Para evaluar la asociación de los SNPs con la presión inmune del hospedero, los polimorfismos relacionados a diez epítopos lineales de células B, reconocidos como blancos para anticuerpos inhibidores, por Chootong y colaboradores en 2010, fueron analizados. Adicionalmente, en cada una de estas regiones antigénicas, se calculó el número de sitios polimórficos (S), sitios únicos (Si), sitios parsimónicos (Pa), número promedio de diferencias entre nucleótidos (K), número de haplotipos (H), diversidad de haplotipos (Hd), diversidad nucleotídica (π), y sus correspondientes desviaciones estándar (SD). De igual forma, se realizaron pruebas de Tajima´s D, Fu & Li´s D* y Fu & Li´s F* para probar la teoría neutral de evolución. Estos fueron calculados en el software DnaSP v5.1 (Librado & Rozas, 2009).

4.8.6. ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN LOS DOMINIOS DE *PVAMA1*

Para estimar la diversidad dentro del gen *Pvama1* se calculó; el número de sitios polimórficos (S), sitios únicos (Si), sitios parsimónicos (Pa), número promedio de diferencias entre nucleótidos (K), número de haplotipos (H), diversidad de haplotipos (Hd) y diversidad nucleotídica (π) para cada uno de los tres dominios. Además, se realizaron pruebas de Tajima´s D, Fu & Li´s D*, Fu & Li´s F* y McDonald-Krietman para probar la teoría neutral de evolución en cada uno de estos. Todos los análisis fueron realizados en el software DnaSP v5.1 (Librado & Rozas, 2009).

4.8.7. REPRESENTACIONES TRIDIMENSIONALES DE LAS ESTRUCTURAS PROTÉICAS

Para determinar el sitio exacto donde se encuentran los polimorfismos y evidenciar las implicaciones que estos pueden tener en la estructura proteica, se utilizaron modelos tridimensionales para las proteínas PvDBPII y PvAMA1 (codificados por los genes *PvdbpII* y *Pvama1*), los cuales fueron realizados en estudios anteriores, y se encuentran disponibles en Protein Data Bank (PDB) con los códigos de acceso 4NUV y 1W81 respectivamente. No obstante, para el gen *Pvrbp1a-2* no se encontró ningún modelo disponible en esta base de datos. La identificación, reconocimiento y señalización de los polimorfismos; así como, regiones, epítopos y estructuras importantes dentro de los modelos tridimensionales de las proteínas fue realizado a través del software Discovery Studio Visualizer v16.1.0.

5. RESULTADOS

5.1. MUESTRAS USADAS EN EL ESTUDIO Y ASIGNACIÓN A LOCALIDADES

Una vez confirmada la presencia de *Plasmodium vivax* en las 91 muestras mediante la técnica de PCR anidada, realizada por Claudia Vera-Arias, estas fueron registradas según su lugar de procedencia y agrupadas en 3 localidades dependiendo de su cercanía geográfica con la finalidad de facilitar el análisis. Las muestras pertenecientes a las provincias de: Guayas (n= 10), El Oro (n=1), Los Ríos (n=11) y Bolivar (n= 5) fueron asignadas como la localidad "Costa" (N=27). Las muestras provenientes de Sucumbios (n=6) y Orellana, cantones Joya de los Sachas y Fco. de Orellana (n=5) fueron asignadas como la localidad "Amazonía Oeste" (N=11). Mientras que las muestras de Orellana, pertenecientes al cantón Aguarico (N=49) fueron asignadas como la localidad "Amazonía Este" (Figura 3).

Cabe mencionar que las muestras Pv051, Pv057 y Pv058 fueron excluidas porque, a pesar de ser reportadas en nuestro país, posiblemente correspondían a casos importados de Perú. Mientras que la muestra Pv091 fue considerada, solamente, para determinar la diversidad genética total de Ecuador. Sin embargo, fue descartada al momento de realizar las comparaciones entre localidades, debido a que esta pertenecía a la provincia de Morona Santiago, y agruparla en alguna de estas no era factible.

5.2. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE GENES DE INVASIÓN EN EL MEROZOÍTO

5.2.1. ANÁLISIS DEL FRAGMENTO 19 DEL GEN *P. VIVAX* MEROZOITE SURFACE PROTEIN 1 (*PVMSP1-19)*

Un fragmento de 294 pb (aminoácidos 1646 y 1743) fue analizado en un total de 72 muestras (Figura 4). La comparación de estas secuencias con la referencia SAL-1 (PVX_099980) determinó solamente una sustitución no sinónima, R1660W (TGG por AGG) correspondiente a la posición 4978 en la secuencia de nucleótidos; y hallada

únicamente en la muestra Pv066. El número promedio de diferencias entre nucleótidos (K) fue de 0,028, la diversidad nucleotídica (π) de 0,00009, el número de haplotipos (H) igual a 2 y la diversidad haplotípica (Hd) de 0,028 (Tabla 2).

5.2.2. ANÁLISIS DE LA REGIÓN II DEL GEN *P. VIVAX* DUFFY BINDING PROTEIN (*PVDBPII*)

Una secuencia de 909 pb (aminoácidos 224-525, según la numeración usada por Fang y colaboradores en 1991) fue analizada en 50 muestras pertenecientes a *P. vivax* ecuatorianos (Figura 5). La comparación de estas secuencias con la referencia SAL-1 (PVX_110810) detectó 44 mutaciones, de las cuales 9 fueron sustituciones sinónimas y 35 sustituciones no sinónimas. De estas 35 mutaciones no sinónimas, 10 (R308S, K371E, G384D, E385K, K386N, H390R, N417K, L424I, W437R y I503K) han sido reportadas ampliamente a nivel global (De Sousa et al., 2011). Además, se halló solamente un sitio trimórfico (I516F/M), mientras que los demás eran dimórficos. Interesantemente, la muestra Pv009 presentó una inserción (CTA) que generó una leucina (L475), y también fue la única donde se encontró la mutación F306L. Los índices de diversidad indicaron un número promedio de diferencias entre nucleótidos (K) de 6,667, diversidad nucleotídica (π) de 0,00736, un número total de 28 haplotipos (H) y una diversidad haplotípica (Hd) igual a 0,940 (Tabla 2).

5.2.3. ANÁLISIS DE LA REGIÓN II DEL GEN *P. VIVAX* RETICULOCYTE BINDING PROTEIN 1A (*PVRBP1A-2*)

Un fragmento de 852 pb (residuos 351-634) fue analizado en un total de 70 muestras de *P. vivax* colectadas en Ecuador (Figura 6). La comparación de estas secuencias nucleotídicas con respecto a la referencia SAL-1 (AY501884) detectó 56 mutaciones, 9 pertenecientes a sustituciones sinónimas y 47 a no sinónimas. Dentro de los cambios no sinónimos se detectaron 5 sitios trimórficos (N352Y/H, E360K/G, D388G/E, G599L/E y Q625R/P); mientras que el resto eran dimórficos. Los índices de diversidad genética para esta región fueron los siguientes: número promedio de diferencias entre nucleótidos (K) de 6,363, diversidad nucleotídica (π) igual a 0,00747, número de haplotipos (H) 31 y diversidad haplotípica (Hd) de 0,924 (Tabla 2).

5.2.4. ANÁLISIS DEL GEN *P. VIVAX* APICAL MEMBRANE ANTIGEN 1 (*PVAMA1*)

Una secuencia de 1593 pb (aminoácidos 1-531) fue analizada en 73 muestras de *P. vivax* ecuatorianos (Figura 7). La comparación de las secuencias nucleotídicas con la referencia SAL-1 (PVX_092275) revelaron 33 SNPs, de los cuales 6 correspondieron a sustituciones sinónimas y 27 a sustituciones no sinónimas. De los 23 residuos polimórficos considerados más frecuentes a nivel global por Arnott y colaboradores en 2013; 18 (G42V, R66K, D107A, R112T, K120R, N130K, N132D, L140I, A141E, E145A, E189K, K190Q, P210S, E277K, K352N, Q380K, L384P y E385D) fueron observados en parásitos ecuatorianos. Adicionalmente, todas las variantes de los residuos encontrados fueron dimórficas. Por otra parte, los índices de diversidad estimaron un número promedio de diferencias entre nucleótidos (K) de 6,986, diversidad nucleotídica (π) igual a 0,00439, 16 haplotipos (H) y una diversidad haplotípica (Hd) de 0,836 (Tabla 2).

5.3. DISTRIBUCIÓN DE HAPLOTIPOS SEGÚN LOCALIDADES

Los polimorfismos observados en las muestras de *P. vivax* ecuatorianos para el gen *PvdbpII* fueron organizados en 28 haplotipos (Tabla 3). Los haplotipos que se encontraron con mayor frecuencia dentro de la población fueron DBPII-H1 (0,1836), seguido de DBPII-H3 (0,1224) y DBPI-H6 (0,1020). Se observó que la Amazonía Este fue la localidad que poseía la mayor cantidad de haplotipos (17), seguida por la Costa (8) y finalmente, la Amazonía Oeste (5). Por otro lado, solamente dos variantes, DBPII-H1 y DBPII-H3 se encontraron compartidas entre localidades. La primera presente en la Amazonía Este y Costa; y la segunda distribuida tanto en la Amazonía Este como Oeste (Figura 8).

Los polimorfismos observados en las muestras de *P. vivax* ecuatorianos para el gen *Pvrbp1a-2* fueron organizados en 31 haplotipos (Tabla 4). El haplotipo RBP1a-H16 fue la variante que estaba presente con mayor frecuencia en la población (0,2028), seguida de RBP1a-H1 (0,1449) y RBP1a-H3 (0,1014). El mayor número de haplotipos fue encontrado en la Amazonía Este (20), seguida de la Costa (9) y la Amazonía Oeste (5).

El haplotipo RBP1a-H3 fue encontrado en las localidades de la Amazonía Este y Oeste; mientras que RBP1a-H5 fue hallado en las tres localidades (Figura 9).

Los polimorfismos observados en las muestras de *P. vivax* ecuatorianos para el gen *Pvama1* fueron organizados en 16 haplotipos (Tabla 5). La variante AMA1-H8 fue el haplotipo con mayor frecuencia dentro de la población (0.3472). Igualmente, la localidad con mayor cantidad de haplotipos fue la Amazonía Este (11), seguida por la Amazonía Oeste (5) y la Costa (3). Por otra parte, AMA1-H2 y AMA1-H12 estaban compartidos entre la Amazonía Este y Oeste; y, únicamente la variante AMA1-H3 estaba presente en la Costa y en la Amazonía Oeste (Figura 10).

5.4. RELACIONES GENÉTICAS ENTRE HAPLOTIPOS

Se realizó una red de haplotipos para tres de los cuatro genes estudiados (*PvdbpII*, *Pvrbp1a-2* y *Pvama1*) (Figuras 11-13), en las cuales se observó varias similitudes entre ellas. En general, en las tres redes se pudo ver que los haplotipos pertenecientes a la Amazonía Este estaban más relacionados con los de la Amazonía Oeste; mientras que la vinculación de los haplotipos de la localidad Costa con respecto a la Región Amazónica (Este y Oeste) fue mucho menor.

En la red de *PvdbpII* se pudo observar que la mayoría de haplotipos mostraron similitud genética según la ubicación geográfica a la que pertenecen. Sin embargo, el haplotipo 4 (DBPII-H4) parecía estar más relacionado con las variantes de la Amazonía Este, a pesar de pertenecer a la localidad Costa. Además, se evidenció que gran parte de los haplotipos que presentaron menor frecuencia solo se diferenciaban en pocas mutaciones con respecto a los que estaban en mayor número dentro de la población (DBPII-H1, DBPII-H3 y DBPII-H6) (Figura 11).

La construcción de la red de haplotipos, basada en el gen *Pvrbp1a-2*, nos indicó que existe una mayor relación y similitud entre los haplotipos conforme a la localidad a la cual pertenecen. Es decir, los haplotipos pertenecientes a la Amazonía Este se agrupaban entre sí en la parte superior; y se encontraban más distanciados que los pertenecientes a la localidad Costa, ubicados en la parte inferior derecha. Por otro lado,

se observó que las variantes correspondientes a la Amazonía Oeste estaban más relacionadas genéticamente con ciertos haplotipos de la Amazonía Este (Figura 12).

La red correspondiente a *Pvama1* mostró una separación menor de haplotipos, es decir mayor relación entre localidades; lo que no ocurrió en las redes pertenecientes a los otros genes. Sin embargo, se observó que las variantes de la Amazonía Este estaban agrupadas entre sí, mostrando mayor semejanza entre ellas. En el caso de AMA1-H14, AMA1-H15 Y AMA1-H16 se diferenciaban, solamente en una mutación, con respecto al haplotipo AMA1-H8, el cual fue el más frecuente en la población. Al contrario de lo que se vio anteriormente, los haplotipos de la localidad Amazonía Oeste parecían estar más relacionados con los provenientes de la Costa; lo mismo que ocurrió con AMA1-H5, que pese a ser encontrado en la localidad del Este, se parecía mucho más al haplotipo AMA1-H1, el cual predominaba en la Costa (Figura 13).

5.5. COMPARACIÓN DE LA DIVERSIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA ENTRE LOCALIDADES

Se realizó una comparación de la diversidad genética de *PvdbpII*, *Pvrbp1a-2* y *Pvama1*, entre las tres localidades (Costa, Amazonía Oeste y Amazonía Este); y se determinó la diferenciación génica entre cada una de ellas. *PvdbpII* mostró mayor diversidad haplotípica en la Amazonía Oeste (0,933). En términos de diversidad nucleotídica, la localidad con más variedad fue la Amazonía Este (0,00588). Respecto a la diferenciación genética, los valores de F_{ST} mostraron una diferenciación moderada entre los parásitos de la Amazonía Oeste y Amazonía Este (0,14257); mientras que existió una muy alta diferenciación entre los parásitos pertenecientes a la Región Amazónica (Este y Oeste) en comparación con los de la Región Costa (Tabla 6).

En *Pvrbp1a-2*, la diversidad de haplotipos más alta fue encontrada en la Amazonía Este (0,875); mientras que el índice de diversidad nucleotídica más elevado fue en la Amazonía Oeste (0,00626). En cuanto las estimaciones de F_{ST}, se considera que hay una diferenciación muy alta de las poblaciones entre las tres localidades (F_{ST} >0,25). Sin embargo, el valor de F_{ST} fue menor (0,30473) al comparar las poblaciones de la Amazonía Este con la Amazonía Oeste (Tabla 7).

En el caso de *Pvama1*, la localidad Amazonía Oeste poseía los valores más altos de diversidad haplotípica (0,893) y diversidad nucleotídoca (0,0693). Por otra parte, la prueba de F_{ST} determinó, al igual que en los genes anteriores, que los parásitos de las localidades pertenecientes a la Región Amazónica (Este y Oeste) poseían una diferenciación genética menor entre sí (0,27113). Igualmente, se vio que la diferencia es mucho más pronunciada entre poblaciones de la localidad Costa y la Amazonía Oeste (0,35536) y Este (0,39884) (Tabla 8).

5.6. COMPARACIÓN DE LA DIVERSIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA ENTRE *P. VIVAX* ECUATORIANOS Y POBLACIONES DE DISTINTOS SITIOS GEOGRÁFICOS

Un total de 688 secuencias, provenientes de distintos países del mundo, fueron utilizadas para comparar la diversidad de la región II del gen *Pvdbp* y, mediante este, establecer el grado de diferenciación genética entre las poblaciones de parásitos. Los análisis revelaron que todos los países, a excepción de México, poseían una elevada diversidad haplotípica (Hd), que va desde 0,919 a 0,993. Se pudo observar que Papúa Nueva Guinea fue el país con mayor número de haplotipos (H) con 72, y que la mayor diversidad nucleotídica (π) residió en Tailandia con 0,01093 (Tabla 9).

Los valores de F_{ST} variaron entre 0,00936 y 0,19427 entre los parásitos ecuatorianos y aquellos provenientes de otros orígenes geográficos. Los valores más bajos fueron encontrados cuando los parásitos fueron comparados con Irán (0,00936), India (0,05616) y Brasil (0,05981); no obstante, la comparación con Irán no fue significativa. En cambio, los valores más altos fueron encontrados cuando se comparó con Colombia (0,19427). Adicionalmente, se pudo observar que la diferencia genética más grande estaba presente entre los parásitos de México y Colombia (0,35432), lo cual es consistente con un estudio previo (González-Cerón et al., 2015) (Tabla 9).

Para el gen *Pvama1*, se usaron 510 secuencias provenientes de 6 países de todo el mundo. Se utilizó una secuencia de 1530 pb para llevar a cabo los análisis de diversidad; y medir la diferenciación genética en términos de F_{ST}. En términos generales, se pudo observar que la diversidad haplotípica (Hd) para este gen es bastante elevada, variando entre 0,909 y 0,996. Sin embargo, Ecuador es el país que posee menor diversidad de

haplotipos (0,836). Además, se evidenció que Tailandia posee el mayor número de haplotipos (96) y también la mayor diversidad nucleotídica (0,00834) (Tabla 10).

Los valores de $F_{ST,}$ para *Pvama1*, variaron entre 0,12935 y 0,48394 en *P. vivax* ecuatorianos y parásitos de otros puntos geográficos. El valor más bajo fue hallado en comparación con Venezuela (0,12935), lo cual indica una diferenciación moderada entre los parásitos de ambas naciones. Por otro lado, el valor más alto fue observado en comparación con Sri Lanka (0,48394); el cual, además, corresponde a la diferenciación más alta entre todos los países analizados. Finalmente, el F_{ST} más bajo entre los 6 países fue observado entre *P. vivax* de India y Tailandia (0,10716) (Tabla 10).

5.7. SELECCIÓN NATURAL EN GENES DE INVASIÓN

Los análisis de neutralidad de Fu & Li's D* y F*, para el gen *PvdbpII*, revelaron valores significativos ($p<0,05$) de -2,99684 y -2,77579 respectivamente. Asimismo, el valor de Tajima's D resultó ser negativo (-1,15380); sin embargo, este no fue significativo. Lo que implica que existió un exceso de alelos en bajas frecuencias dentro de la población, posiblemente producto de un barrido selectivo o crecimiento poblacional. Por otra parte, la prueba de McDonald-Kreitman reveló un resultado no significativo ($p=0,098$, basado en el test exacto de Fisher), sugiriendo que no existe desviación de la neutralidad en la región II de *Pvdbp* (Tabla 11).

En el fragmento *Pvrbp1a-2* los valores de Fu & Li's D* (-3,48451) y Fu & Li's F* (-1,50687) resultaron ser altamente significativos ($p<0,02$); mientras que el valor de Tajima's D fue de -1,50687, no significativo (Tabla 11). Lo que indica que existe un exceso de alelos en bajas frecuencias, posiblemente producto de un barrido selectivo o crecimiento poblacional. Desafortunadamente, la prueba de McDonald-Kreitman no pudo ser realizada para confirmar este resultado debido a que no existe un gen ortólogo en *P. knowlesi* para ser comparado.

Por el contrario, en el gen *Pvama1* los resultados de las pruebas de Fu & Li D* y F* resultaron en valores no significativos iguales a 0,81125 y 0,64509 respectivamente. Así como la prueba de Tajima's D, que a pesar de ser ligeramente positiva (0,09268), no fue significativa (Tabla 11). Esto nos mostró que, posiblemente, hubo un exceso de alelos

en frecuencias intermedias, lo cual podría darse por efecto de selección balanceadora o corresponde a una población estructurada. En cuanto a la prueba de McDonald-Kreitman, los resultados revelaron un valor altamente significativo (p=0,000007, basado en el test exacto de Fisher) (Tabla 11). Lo que demostró que hay desviación de la neutralidad, posiblemente por acción de selección balanceadora, en *Pvama1* de *P. vivax* ecuatorianos.

5.8. POLIMORFISMOS EN EPÍTOPOS DE CÉLULAS B EN PVDBPII

Para evaluar la asociación entre la selección natural positiva y la evasión inmune del huésped, se examinó la diversidad genética en los epítopos de células B inhibidores de unión. Los 10 epítopos fueron agrupados en 3 categorías: inhibición de unión alta o high binding inhibitory (H1, H2 y H3), inhibición de unión media o medium binding inhibitory (M1, M2 y M3) e inhibición de unión baja o low binding inhibitory (L1, L2, L3 y L4) (Chootong et al., 2010) (Figura 14).

Los análisis de estas secuencias determinaron que los epítopos H3 (5), M2 (3) y L2 (3) poseían la mayor cantidad de polimorfismos (Figura 15). Por otro lado, la mayor diversidad haplotípica (Hd) y nucleotídica (π) estaba presente en H3 (0,732 y 0,03469), M2 (0,607 y 0,02405) y M3 (0,525 y 0,01131). En contraste, los epítopos M1, L1 y L4 resultaron ser altamente conservados en las secuencias de *P. vivax* ecuatorianos. A pesar de que las pruebas de neutralidad no fueron significativas, los valores relativamente altos en los epítopos H3 (1,19195), M2 (1,49477) y L3 (1,32891) mostraron cierto alejamiento de la neutralidad e indicaron una posible acción de selección balanceadora (Tabla 12).

5.9. DIVERSIDAD GENÉTICA Y SELECCIÓN NATURAL DENTRO DEL GEN *PVAMA1*

La diversidad genética fue evaluada de forma independiente para los tres dominios de *Pvama1*, con el fin de identificar la región más variable. Los análisis permitieron evidenciar, claramente, que el dominio I (DI) fue el más diverso dentro de todo el gen (Figura 16). La región DI registró 19 sitios polimórficos (S), 11 haplotipos (H), una diversidad haplotípica (Hd) y nucleotídica (π) de 0,730 y 0,00831 respectivamente. Por el contrario, en el dominio III solo se encontraron 4 polimorfismos y un total de 5

haplotipos; lo que determinó una diversidad haplotípica (Hd) de 0,331 y una diversidad nucleotídica igual a 0,00137 (Tabla 13).

Las pruebas de neutralidad de Fu & Li D* y F*, realizadas para el dominio I, dieron como resultado 1,26773 y 1,20698 respectivamente, y el valor de Tajima's D fue de 0,56456. Sin embargo, y a pesar de que estas pruebas muestran alejamiento de la neutralidad, no fueron significativas. No obstante, la prueba de McDonald-Krietman dio como resultado un valor altamente significativo (p=0,009933, basado en el test exacto de Fisher), evidenciando la influencia de selección balanceadora en este dominio (Tabla 14).

En el dominio II los valores de Fu & Li D* y F* fueron de 0,51261 y 0,47490 respectivamente; mientras que el valor de Tajima's D fue igual a 0,18210. Al igual que en el dominio I, estas pruebas no resultaron ser significativas, pero si lo fueron para el test de McDonald-Krietman (p=0,000707, basado en el test exacto de Fisher), sugiriendo desviación de la neutralidad en ambos dominios (Tabla 14).

6. DISCUSIÓN

En Ecuador la malaria ha constituido un importante problema de salud pública a lo largo del tiempo. Sin embargo, en los últimos 15 años, el número de casos reportados se ha reducido en, aproximadamente, un 99%; lo que ha colocado al país en fase de pre eliminación. A pesar de esto, se registran varios brotes periódicos en las regiones endémicas, y a partir del 2015 los casos se han incrementado; perjudicando a los sectores más vulnerables de la población (Sáenz et al., 2017).

Pese a que los métodos de control tradicionales han logrado disminuir la carga de esta enfermedad, el enfoque en nuevas formas de control es necesario para contribuir en la vigilancia epidemiológica. En ese sentido, varias proteínas pertenecientes a los merozoítos han sido ampliamente estudiadas y consideradas como potenciales candidatos para el desarrollo de una futura vacuna, debido a su capacidad inmunogénica y al rol esencial que cumplen en el proceso de invasión. Se ha observado que los antígenos presentes en estos estadios eritrocíticos constituyen un importante mecanismo para generar inmunidad natural dentro del humano en contra de esta enfermedad. Sin embargo, encontrar el sitio adecuado, el cual sea conservado y al mismo tiempo genere una respuesta inmune elevada y duradera, aún constituye un reto. Asimismo, el análisis de diversidad en estos antígenos permite determinar los haplotipos más frecuentes en un territorio; así como aquellos que se encuentran compartidos entre las poblaciones de *P. vivax* provenientes de distintas zonas endémicas. Esto, al momento de realizar una vacuna basada en estos antígenos, es de gran importancia, ya que permite incluir el número de haplotipos necesarios para abarcar la mayor cantidad posible de variantes del parásito. Por lo tanto, investigaciones sobre la diversidad de los principales genes involucrados en el proceso invasivo de reticulocitos son prioritarios en la búsqueda de un candidato óptimo para la realización de nuevas herramientas de control. El presente estudio determinó la diversidad de los principales genes del merozoíto involucrados en la invasión reticulocítica en *P. vivax* ecuatorianos; así como la variabilidad de estos según distintas localidades. Además, proporciona una noción sobre la diversidad de *P. vivax* encontrada en nuestro territorio en comparación a otros países endémicos.

6.1. DIVERSIDAD DE GENES INVASIVOS

Diferentes factores biológicos y socioeconómicos contribuyen, de varias formas, al mantenimiento de la diversidad en *P. vivax*, incluyendo las recaídas ocasionadas por hipnozoítos, el desarrollo temprano del gametocito, las infecciones asintomáticas; y la demora en el diagnóstico y tratamiento (Mendis et al., 2001; Barry et al., 2015). Sin embargo, la selección natural ejercida por la respuesta inmune del huésped y la recombinación meiótica, entre distintas variantes de parásitos dentro del intestino del mosquito, son los dos mecanismos principales que actúan sobre los genes invasivos del merozoíto para generar y mantener su diversidad (Escalante et al., 2001; Sousa et al., 2010; Dias et al., 2011).

6.1.1. DIVERSIDAD EN *PVMSP1-19*

En las 72 muestras analizadas para el gen *Pvmsp1-19*, solamente se encontró una sustitución de **T**GG por **A**GG en la posición 4978, provocando un cambio de triptófano por arginina en el residuo 1660 (R1660W). Este polimorfismo fue encontrado en la muestra Pv066, perteneciente a la Amazonía Este, y parece ser el primer reporte de esta sustitución; ya que anteriormente solo se han reportado las mutaciones D1706E (Zeyrek et al., 2010), K1709E (Pasay et al., 1995) y N1692K (Kang et al., 2012). Por consiguiente, los índices de diversidad haplotípica (Hd) y nucleotídica (π) fueron extremadamente bajos, 0,028 y 0,00009 respectivamente (Tabla 2). Esto demuestra que el fragmento *Pvmsp1-19* es altamente conservado en *P. vivax* ecuatorianos, así como en otras poblaciones de parásitos provenientes de distintos lugares del mundo (Pasay et al., 1995; Soares et al., 1999; Putaporntip et al., 2002; Kang et al., 2012; González-Cerón et al., 2015).

Durante la invasión $MSP1_{42}$ atraviesa por un proceso de clivaje, formando los fragmentos $MSP1_{33}$ y $MSP1_{19}$. Solamente este último permanece en la superficie del merozoíto y es llevado al interior del reticulocito invadido (Blackman et al., 1990; Blackman & Holder, 1992). Estudios sobre esta región han determinado que, únicamente, $MSP1_{33}$ es altamente polimórfico, probablemente debido a que está bajo una mayor presión selectiva por parte del sistema inmune (Kang et al., 2012; Gonazález-Cerón et al., 2015). Al parecer, y a pesar de que $MSP1_{19}$ es el fragmento involucrado en la respuesta

humoral, toda la carga de la respuesta inmune del huésped provocada por la proteína MSP1 se concentra en $MSP1_{33}$ (Huaman et al., 2008). Este, posiblemente, es un mecanismo del parásito que le permite mantener conservado el fragmento $MSP1_{19}$, el cual cumple un papel importante en el posterior desarrollo del esquizonte, especialmente en la formación de la vacuola digestiva (Dluzewski et al., 2008).

6.1.2. DIVERSIDAD Y SELECCIÓN NATURAL EN *PVDBPII*

Los datos obtenidos en el análisis del gen *PvdbpII* en 50 muestras de *P. vivax* ecuatorianos revelaron 35 sustituciones no sinónimas (Tabla 3), de las cuales 10 (R308S, K371E, G384D, E385K, K386N, H390R, N417K, L424I, W437R y I503K) han sido reportadas ampliamente en distintas zonas endémicas (De Sousa et al., 2011). Adicionalmente, los residuos polimórficos en las posiciones N417K, W437R y I503K, hallados en la mayoría de las muestras colectadas, han sido reportados como blancos de anticuerpos inhibidores de unión eritrocítica. Lo que sugiere que estas mutaciones, solas o combinadas, podrían reducir la eficacia de unión de estos anticuerpos (VanBuskirk et al., 2004; McHenry et al., 2011).

Interesantemente, la mutación F306L, encontrada en Pv009 (perteneciente a la localidad Costa), solamente había sido reportada en aislados de Asia; incluyendo Tailandia (Gosi et al., 2008), Irán (Babaeekho et al., 2009), Sri Lanka (Premaratne et al., 2011) y Myanmar (Ju et al., 2012). Este polimorfismo, al parecer, también podría estar involucrado en la evasión del sistema inmune, debido a que se ubica dentro de uno de los epítopos de células B inhibidores de unión (Chootong et al., 2010). Asimismo, Pv009 fue la única muestra que presentó la inserción del codón CTA, el cual codifica para una leucina entre el aminoácido 474 y 475. Esta inserción ha sido hallada en muestras pertenecientes a India, Irán, Indonesia, Tailandia y Brasil (Valizadeh et al., 2014). Al parecer, ambos eventos mutacionales (F306L y L475) ocurren de forma independiente de su origen.

Adicionalmente, se evidenció que existe una alta diversidad en las muestras de parásitos ecuatorianos y, que el nivel más alto en términos de diversidad haplotípica (0,940), fue hallado en este gen (Tabla 2). Esto coincide con varios estudios realizados en diferentes países endémicos en los que se han encontrado niveles similares de diversidad,

independientemente del número de muestras utilizadas (Ampudia et al., 1996; Sousa et al., 2010; Premaratne et al., 2011; Ju et al., 2012; Ju et al., 2013). Esto demuestra que la región II del gen *Pvdbp* es altamente polimórfica a nivel nacional, y confirma su alta diversidad a nivel mundial.

No se evidenció una clara desviación de la neutralidad en esta región, debido a que las pruebas de Tajima's D y McDonald-Krietman resultaron no significativas (Tabla 11). Pese a esto, los valores significativos de Fu & Li's D* y F* podrían estar sugiriendo cierto tipo de desvío. Si bien la prueba de Tajima's D no fue significativa, su valor negativo (-1,15380), al igual que los valores de Fu & Li's D* (-2,996) y F* (-2,775), nos indican que existe un exceso de alelos en bajas frecuencias, sugiriendo un evento de barrido selectivo reciente (Escalante et al., 2004). Esto quiere decir que, posiblemente, ocurrió una mutación dentro de esta región, la cual fue más eficaz al momento de evadir la respuesta inmune. Por ende, incrementó la aptitud de estos parásitos. Esta mutación, al generar una ventaja adaptativa en los individuos, incrementó rápidamente su frecuencia dentro de la población; de la misma forma que los polimorfismos cercanos a esta. Lo que provocó cierta reducción de la variabilidad dentro del fragmento (Futuyma, 2013). Estos resultados son similares a los obtenidos en México por González-Cerón y colaboradores en 2015; pero son contradictorios con respecto a estudios previos en los que se observó indicios de selección balanceadora en *PvdbpII* (Ampudia et al., 1996; Cole-Tobain & King, 2003; Gosi et al., 2008; Premaratne et al., 2011; Ju et al., 2012, 2013). No obstante, estos mismos valores obtenidos en las pruebas de Tajima's D y Fu & Li's D* y F* podrían indicar que esta población se encuentra en crecimiento (Escalante et al., 2004).

Con respecto a los epítopos de células B inhibidores de unión; los epítopos H3 (alta inhibición de unión), M2 (media inhibición de unión) y L3 (baja inhibición de unión) fueron aquellos donde se encontró mayor diversidad haplotípica (Hd) y nucleotídica (π) (Tabla 12). Asimismo, estas secuencias obtuvieron valores positivos para las pruebas de Fu & Li's D* y F* y Tajima's D, que, pese a no ser significativas, sugieren que estas regiones, posiblemente, tienden a estar bajo selección balanceadora. Esto concuerda con otras investigaciones, donde se determinó que, especialmente, H3 está sujeto a esta presión selectiva por parte del sistema inmune (Cole-Tobain & King, 2003; Souza-Silva et al., 2010; Valizadeh et al., 2014). Además, un estudio realizado en Brasil determinó

que los residuos en las posiciones 417, 419 y 424; es decir dentro de M2, están más asociados con selección balanceadora (Sousa et al., 2010).

Los resultados previamente expuestos nos indican que la selección natural actúa de manera diferente dentro de PvDBPII. Sectores de esta región (epítopes), acumulan una mayor cantidad de polimorfismos, con el afán de generar estructuras variables que sean irreconocibles por células B, permitiéndole al parásito evadir la respuesta inmune y lograr invadir con éxito los reticulocitos. Por otro lado, existen regiones que están evolucionando de manera neutral. Este contraste en la detección de diferentes tipos de presión selectiva aplicada a *PvdbpII* ha sido previamente reportado para esta región, al igual que para la región IV de esta misma proteína (Cole-Tobain & King, 2003; Martinez et al., 2004; Sousa et al., 2010). Esto puede implicar un balance entre la alta restricción funcional, manteniendo estructuras invariables debido al importante papel que cumple la proteína DBP en la unión reticulocítica para su invasión; y la búsqueda de diversidad como respuesta en contra de la presión del sistema inmune del huésped (Martinez et al., 2004).

6.1.3. DIVERSIDAD Y SELECCIÓN NATURAL EN *PVRBP1A-2*

Los análisis del fragmento *Pvrbp1a-2* en las 70 muestras de *P. vivax* ecuatorianos revelaron 9 sustituciones sinónimas y 47 no sinónimas (Tabla 4). De estos, 5 residuos fueron trimórficos (N352Y/H, E360K/G, D388G/E, G599L/E y Q625R/P); mientras que los demás fueron dimórficos. Adicionalmente, se encontraron 4 secuencias (Pv009, Pv034, Pv057 y Pv066) que fueron exactamente iguales a la referencia SAL-1. Interesantemente, cada una de estas pertenecía a una localidad distinta; Pv009 (Costa), Pv034 (Amazonía Oeste), Pv066 (Amazonía Este) y Pv057 correspondiente a un caso importado de Perú. Por otra parte, este gen fue uno de los más diversos encontrados en este estudio (junto con *PvdbpII*); y el que posee mayor diversidad nucleotídica (π) (0,00747) (Tabla 2). Estudios anteriores sobre *Pvrbp1a* han demostrado que la región comprendida entre los aminoácidos 435 y 777 es la más polimórfica de toda la proteína, sugiriendo ser blanco de anticuerpos (Carballo et al., 2007; Ferreira et al., 2014).

Las pruebas de neutralidad para este gen revelaron valores altamente significativos para Fu & Li's D* (-3,800) y F* (-3,484). Sin embargo, esto no ocurrió con

la prueba de Tajima's D (-1,506) que no fue significativa (Tabla 11). Estos resultados sugieren que, al igual que en *PvdbpII*, esta región de la proteína atravesó por un proceso de barrido selectivo. Probablemente, existió una mutación que generó una ventaja adaptativa en los parásitos (mayor eficiencia para evadir la respuesta inmune), la cual incrementó rápidamente su frecuencia dentro de la población y generó una disminución de la variabilidad en este fragmento (Futuyma, 2013). Sin embargo, los valores obtenidos en las pruebas de Tajima's D y Fu & Li's D* y F* también podrían referirse a una población que se encuentra en crecimiento (Escalante et al., 2004). Por otra parte, la prueba de McDonald-Kreitman no pudo ser realizada, debido a que el gen ortólogo de *Pvrbp1a* en *P. knowlesi* corresponde a un pseudogen altamente degenerado (*ψpknbp1*). Solamente ciertos fragmentos en el extremo 5' de este pseudogen poseen un alto nivel de identidad con *Pvrbp1a*. Sin embargo, el resto de la secuencia ha perdido por completo su relación con el gen de *P. vivax*; presuntamente por un evento de recombinación antiguo (Meyer et al., 2009). Por lo tanto, la comparación entre las secuencias *ψpknbp1* (*P. knowlesi*) y *Pvrbp1a* (*P. vivax*) no fue posible.

6.1.4. DIVERSIDAD Y SELECCIÓN NATURAL EN *PVAMA1*

El análisis de la secuencia completa del gen *Pvama1* en 73 muestras de *P. vivax* ecuatorianos revelaron un total de 33 SNPs, de los cuales 6 fueron sustituciones sinónimas y 27 no sinónimas (Tabla 5). De las 27 mutaciones no sinónimas, 18 han sido ampliamente reportadas en varios países endémicos (Arnott et al., 2013). Además, se encontraron polimorfismos en las posiciones E145A, P210S, R249H, K352N y N445D; los cuales han sido identificados por solaparse con epítopos de células B. En consecuencia, estos cambios de aminoácidos podrían afectar la estructura proteica, causando cambios en la carga y polaridad de esta; y ayudando al parásito a escapar de la respuesta inmune del huésped (Zakeri et al., 2013). De la misma manera, las sustituciones Q380K y L384P, encontradas en este estudio, han sido implicadas en la alteración de la estructura de la proteína PvAMA1. Estas podrían reducir la afinidad de unión en los epítopos e inclusive la pérdida de este epítopo lineal; ya sea juntas o en combinación con otras mutaciones (Dias et al., 2011; Zakeri et al., 2013).

Por otro lado, se puede observar que la mayoría de estos residuos polimórficos se localizan en un solo lado del ectodominio PvAMA1 (cara activa), sugiriendo que esta

cara de la proteína se encuentra más expuesta a la respuesta por parte del sistema inmune del huésped (Arnott et al., 2013). Adicionalmente, la mayor parte de estos se concentran dentro de los dominios I y II; sugiriendo que existe una mayor presión inmune en estos sitios. Por el contrario, solamente 4 residuos polimórficos (G42V, T44S, R66K y S70F) fueron localizados en la otra cara de la proteína (cara silenciosa), la cual parece no tener relevancia inmunológica (Figura 17). Además, algunos de estos residuos polimórficos se agrupan en cierta parte de la proteína y forman una especie de "escudo" que mantiene conservada la hendidura de unión con el ligando RON 2. Este podría ser un mecanismo del parásito para desviar la respuesta inmune del huésped, acumulando mutaciones en regiones no relevantes, y así mantener conservadas estructuras sumamente importantes para el proceso invasivo (Bai et al., 2005). Adicionalmente, se ha visto que los residuos E145A, N132D, N130K y K120R, cercanos a la hendidura, podrían tener una importancia funcional (Zakeri et al., 2013) (Figura 18).

Los índices de diversidad haplotípica (Hd) y nucleotídica (π), 0,836 y 0,00439 respectivamente, demuestran una diversidad moderada en este gen, y menor a la obtenida en *PvdbpII* y *Pvrbp1a-2* (Tabla 2). Lo cual es consistente con estudios publicados anteriormente, donde se observaron niveles de diversidad similares para *Pvama1* en países como: Venezuela (Ord et al., 2008), Papúa Nueva Guinea (Arnott et al., 2014), Tailandia, India y Sri Lanka (Arnott et al., 2013).

Las pruebas de neutralidad de Fu & Li's D* (0,811) y F* (0,645) y Tajima's D (0,092), pese a no ser significativas, mostraron una ligera desviación de la neutralidad. Esto fue confirmado por la prueba de McDonald-Krietman que determinó un valor altamente significativo (p=0,000007), evidenciando la presencia de selección balanceadora sobre este gen (Tabla 11). Asimismo, se realizó la prueba de McDonald-Krietman para cada uno de los dominios de *Pvama1*; y los resultados mostraron valores significativos para los dominios I (p=0,0099) y II (p=0,0007) (Tabla 14). Lo que concuerda con varias investigaciones previas, donde se han encontrado indicios de selección balanceadora en el dominio I de *Pvama1* (Ord et al., 2008; Arnott et al., 2013; Arnott et al., 2014; Kang et al., 2015). Además, esto coincide con los hallazgos reportados en Sri Lanka, donde se demostró que existe selección balanceadora en el dominio II; y que esta región de la proteína es altamente inmunogénica (Múfalo et al., 2008; Gentil et al., 2010; Dias et al., 2011).

La selección balanceadora implica el mantenimiento de los polimorfismos, específicamente en DI y DII (Futuyma, 2013). Esto quiere decir que, la presión ejercida por parte del sistema inmune del humano provoca que los parásitos mantengan las mutaciones dentro de ambos dominios. Esta amplia variedad de residuos polimórficos permite a los parásitos modificar la estructura de los epítopos, con el fin de evitar ser reconocidos por anticuerpos que inhiban su unión a los reticulocitos. De esta forma, los parásitos tratan de encontrar distintas vías para evadir la respuesta inmune. Además, producto de estar fuerza selectiva, se genera y mantiene la diversidad dentro de los dominios DI y DII en *Pvama1*.

6.2. DIVERSIDAD Y ESTRUCUTRA POBLACIONAL DE *P. VIVAX* EN LOCALIDADES ECUATORIANAS

La distribución de los haplotipos para *PvdbpII, Pvrbp1a-2* y *Pvama1* revelan una mayor cantidad de variantes en la Amazonía Este (Figuras 8-10). Esto podría deberse a que, a pesar de que la transmisión es baja e inestable en las áreas endémicas de nuestro país, existen brotes periódicos, como el ocurrido en 2015 en el cantón Aguarico (Orellana). El cual generó una mayor circulación del parásito; por ende, un mayor nivel de recombinación de este. Además, debido a este brote, el número de muestras pertenecientes a esta localidad fue mayor en comparación al resto y esto permitió obtener más datos que reflejen con mayor precisión la situación de la Amazonía Este. Adicionalmente, la circulación de personas en esta zona fronteriza pudo causar el ingreso de parásitos provenientes de Perú, lo que aportó a la diversidad de *P. vivax* en esta zona.

Por otro lado, se pudo determinar que existen pocos haplotipos compartidos entre localidades y, al observar las redes de haplotipos, se puede ver que la gran mayoría de estos muestran más relación genética según la localidad a la que pertenecen (Figuras 11-13). Además, en general, se observa que las variantes de la Amazonía Oeste se encuentran más relacionadas con las de la Amazonía Este; y que ambas poseen menos similitud genética con respecto a la localidad Costa. Esto se complementa con los análisis de F_{ST}, los que mostraron una gran diferencia entre los individuos de la región Costa y los de la Región Amazónica (0,355-0,556). Asimismo, esta diferenciación genética fue menos pronunciada al comparar entre individuos de la Amazonía Este y Oeste (0,142-0,304).

Estos resultados implican que el entrecruzamiento entre los parásitos pertenecientes a ambas regiones es mucho más difícil, debido a la distancia geográfica; así como a la presencia de la Cordillera de los Andes. A diferencia de ello, las poblaciones de la Amazonía (Este y Oeste) son más parecidas entre ellas dado que la mayoría de los parásitos que circulan en estas zonas han heredado características de progenitores genéticamente comunes y porque el flujo génico entre estas dos localidades no se ve afectado por una barrera geográfica importante (Schousboe et al., 2014).

Los resultados de este estudio se comparan con el estudio realizado por Vélez-Álvarez et al., (2015); en el cual se utilizaron microsátélites, en estas mismas muestras, con el fin de caracterizar las poblaciones de *P.vivax* ecuatorianas. Los hallazgos determinaron que las localidades de la Amazonía poseían una diversidad genética ligeramente más alta, en términos de heterocigosidad esperada, con respecto a la Región Costa. De igual forma, los valores de F_{ST} indicaron que existe gran diferenciación entre los individuos de la Amazonía y Costa (F_{ST}=0,1341), provocada por la distancia geográfica y las barreras geológicas. A diferencia de ello, entre las poblaciones de la Amazonía (Este y Oeste) se observó una diferenciación genética moderada (F_{ST}=0,05674). Asimismo, la red de haplotipos evidenció que los individuos poseían gran similitud genética con respecto a su ubicación geográfica y, que las muestras de la Amazonía Este presentan más conexión con los parásitos de la localidad Amazonía Oeste. Si bien es cierto que los genes utilizados en el presente estudio son distintos y están sujetos a presión selectiva, los resultados son similares a los expuestos anteriormente usando microsatélites. Esto sugiere que las poblaciones de *P. vivax* presentes en las regiones endémicas de Ecuador parecen estar claramente estructuradas.

6.3. COMPARACIÓN DE LA DIVERSIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA ENTRE POBLACIONES DE *P. VIVAX* DE DISTINTOS SITIOS GEOGRÁFICOS

6.3.1. DIVERSIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA ENTRE POBLACIONES DE *P. VIVAX* PARA EL GEN *PVDBPII*

Al comparar la diversidad de *PvdbpII* encontrada en diferentes países del mundo, se demostró que existen altos niveles de diversidad haplotipica (Hd) entre las poblaciones de *P. vivax*. Únicamente las muestras provenientes del Sur de México poseen valores relativamente bajos en comparación con el resto de países (0,553) (Tabla 9). Sin embargo, se ha visto que la diversidad genética, particularmente en *PvdbpII*, no está relacionada con los niveles de endemicidad de malaria, ya que se han observado patrones similares en áreas con transmisión baja e inestable, como Brasil; así como en áreas altamente endémicas como Papúa Nueva Guinea (Sousa et al., 2011). Lo cual es consistente con la situación actual de nuestro país que, a pese a tener las mismas características de transmisión que Brasil, posee una diversidad bastante alta.

Los análisis de F_{ST} en base a *PvdbpII* encontraron una diferenciación genética alta entre las poblaciones de *P. vivax* ecuatorianas y los parásitos provenientes de Colombia (0,19427). Mientras que la disimilitud fue baja al compararlos con poblaciones de Irán (0,00936; $p>0,05$); y moderada con respecto a parásitos de India (0,056) y Brasil (0,059) (Tabla 9). Evidenciando que no existe una relación según el origen geográfico para este gen. Esto concuerda con el estudio hecho por De Sousa et al., (2011); en el cual se tomaron secuencias de *PvdbpII* provenientes de distintos sitios geográficos. En general, se observó baja diferenciación de las poblaciones de parásitos entre países. Además, se determinó que los haplotipos encontrados no estaban relacionados geográficamente a su origen, debido a que estaban presentes en los ocho países estudiados, pero en distintas proporciones.

Algo muy similar ocurrió al comparar la diversidad genética y la estructura poblacional de distintos antígenos, candidatos a vacunas, en *P. falciparum*. Los resultados revelaron que los antígenos propios del merozoíto poseían, generalmente, altos niveles de diversidad a nivel global. Asimismo, estos haplotipos se distribuían mundialmente, y tenían bajos niveles de diferenciación entre y dentro de regiones. Lo que sugiere que la diversidad de los antígenos del merozoíto, más que ser influenciada por barreras geográficas, está siendo afectada por características intrínsecas de las poblaciones humanas, principalmente la respuesta inmune (Barry et al., 2009).

6.3.2. DIVERSIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA ENTRE POBLACIONES DE *P. VIVAX* PARA EL GEN *PVAMA1*

Al comparar la diversidad de *Pvama1* proveniente de distintos países, se reveló una diversidad haplotípica (Hd) muy elevada, a excepción de Ecuador, que, a pesar de tener una diversidad relativamente alta (0,836), es menor al resto de territorios endémicos utilizados para este análisis (Tabla 10). Al parecer, la diversidad de *Pvama1* estaría relacionada con la intensidad de transmisión (Imwong et al., 2007; Osier et al., 2010), esto explicaría por qué los niveles más altos de π (0,00834) y Hd (0,996) estarían en Tailandia y Papúa Nueva Guinea respectivamente, países caracterizados por su transmisión continua de *P. vivax*. Por ende, Ecuador al ser un país con transmisión baja e inestable, posee una diversidad más baja.

Los valores de F_{ST} dieron como resultado una diferenciación genética moderada entre los parásitos pertenecientes a Ecuador y Venezuela (0,129); mientras que se encontró una diferenciación genética muy alta entre *P. vivax* ecuatorianos y aquellos pertenecientes a Sri Lanka (0,483) (Tabla 10). Esto demuestra una mayor relación genética entre los parásitos de estas dos naciones (Ecuador y Venezuela), posiblemente por su cercanía y por la falta de barreras de flujo génico importantes en esta región. Todo lo contrario, ocurre al comparar los parásitos provenientes de Ecuador y Sri Lanka, en los cuales se puede evidenciar una alta diferenciación genética, probablemente por la amplia distancia geográfica y la gran variedad de barreras geográficas entre ambos países.

Al parecer, debido a las diferencias en el espectro de la endemicidad y el perfil de respuesta inmune, tanto la recombinación como la selección parecen estar actuando diferencialmente entre distintas áreas geográficas (De Sousa et al., 2011). De acuerdo con esto, se sugiere que la recombinación cumple un papel determinante en la estructura haplotípica en ambos genes (*PvdbpII* y *Pvama1*). El proceso de recombinación genética de los parásitos tiene lugar en el vector, como parte del ciclo de vida de *Plasmodium*, y probablemente se ve favorecido en casos de pacientes con infecciones múltiples. Es decir, infecciones simultáneas dentro de un huésped con más de una variante del parásito (De Sousa et al., 2011). Además, esta capacidad de adquirir infecciones múltiples estaría dada por características propias de *P. vivax*, como la gametogénesis temprana y los relapsos (Krotoski et al., 1989; McKenzie et al., 2007). En el caso de la gametogénesis temprana,

podría permitir una transmisión mucho más eficiente al mosquito, antes de que aparezcan los síntomas y, por lo tanto, antes de que se inicie el tratamiento farmacológico. Mientras que los relapsos aumentarían la probabilidad de generar infecciones mixtas a medida que ocurran nuevas inoculaciones (De Sousa et al., 2011).

7. CONCLUSIONES

La diversidad en los principales genes involucrados en la invasión de reticulocitos en *P. vivax* ecuatorianos resultó ser distinta en cada gen, dependiendo el rol que cumple cada uno en este proceso. Posiblemente, la prolongada exposición de *PvdbpII* y *Pvrbp1a-2* al sistema inmune contribuye para mantener una diversidad muy alta. Mientras que *Pvama1*, al exponerse en menor medida posee diversidad moderada. Por el contrario, *Pvmsp1-19*, pese a estar presente desde el contacto inicial, no está del todo expuesto y; por ende, demostró ser un fragmento bastante conservado.

Se identificó una mayor diversidad en las localidades pertenecientes a la Amazonía, producto de los constante brotes en esta zona; y los haplotipos hallados en estas (Este y Oeste) estaban más relacionados entre sí, debido a su cercanía geográfica, que con las variantes pertenecientes a la Costa. Además, se observaron pocos haplotipos compartidos entre localidades, debido a que la gran mayoría eran variantes únicas de cada localidad.

La selección natural se comporta de manera distinta en cada gen y, a su vez esta actúa diferencialmente a través de las proteínas. Los genes *PvdbpII* y *Pvrbp1a-2*, posiblemente, fueron afectados por un proceso de barrido selectivo; mientras que en *Pvama1* se evidenció la influencia de selección balanceadora, la cual actúa principalmente en los dominios I y II.

La diversidad en *PvdbpII* y *Pvama1* encontrada en *P. vivax* ecuatorianos es muy similar a la encontrada en otros países endémicos de malaria, incluso en territorios donde los niveles de transmisión son altos y continuos; sugiriendo que la diversidad no se relaciona con los niveles de endemicidad. Además, la diferenciación genética entre las distintas poblaciones de parásitos no fue muy pronunciada, especialmente en *PvdbpII*.

8. RECOMENDACIONES

Obtener mayor número de muestras para cada localidad nos permitiría determinar con mayor certeza la diversidad de cada uno de estos genes. De la misma forma, obtener muestras provenientes de cada una de las provincias donde se reportan casos sería óptimo para tener una idea clara sobre la diversidad real en los genes invasores de *Plasmodium vivax* ecuatorianos.

Para entender de mejor forma la dinámica de invasión de los merozoítos de *P. vivax* y la importancia de ciertas proteínas en la invasión celular, el estudio de otros genes, codificantes para estos ligandos, implicados en este proceso como: *Pvrbp1b*, *Pvrbp2a*, *Pvrbp2b* y *Pvrbp2c* es necesario. Además, permitirá esclarecer ciertas interrogantes sobre la biología de los merozoítos al momento de invadir reticulocitos.

A pesar de que la región analizada (*Pvrbp1a-2*) ha sido considerada, en estudios previos, como el sitio de unión con los reticulocitos; el análisis completo de este gen permitirá conocer el sitio exacto de unión de esta proteína con las células eritrocíticas inmaduras.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, J. H., Hudson, D. E., Torii, M., Ward, G. E., Wellems, T. E., Aikawa, M., & Miller, L. H. (1990). The Duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. *Cell, 63*(1), 141-153.

Adams, J. H., Sim, B. K., Dolan, S. A., Fang, X., Kaslow, D. C., & Miller, L. H. (1992). A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 89*(15), 7085-7089.

Aikawa M, Miller LH, Rabbege J. (1975). Caveola–vesicle complexes in the plasmalemma of erythrocytes infected by *Plasmodium vivax* and *P. cynomolgi*.Unique structures related to Schuffner's dots. *The American Journal of pathology, 79*: 285–300.

Aikawa, M., Miller, L. H., Johnson, J., & Rabbege, J. (1978). Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *The Journal of cell biology, 77*(1), 72-82.

Ampudia, E., Patarroyo, M. A., Patarroyo, M.E., Murillo, L.A. (1996). Genetic polymorphism of the Duffy receptor binding domain of *Plasmodium vivax* in Colombian wild isolates. *Mol Biochem Parasitol 78*: 269–272.

Arnott, A., Mueller, I., Ramsland, P. A., Siba, P. M., Reeder, J. C., & Barry, A. E. (2013). Global Population Structure of the Genes Encoding the Malaria Vaccine Candidate, *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 (Pv AMA1). *PLoS Negl Trop Dis, 7*(10), e2506.

Arnott, A., Wapling, J., Mueller, I., Ramsland, P. A., Siba, P. M., Reeder, J. C., & Barry, A. E. (2014). Distinct patterns of diversity, population structure and evolution in the AMA1 genes of sympatric *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* populations of Papua New Guinea from an area of similarly high transmission. *Malaria journal, 13*(1), 233.

Babaeekho, L., Zakeri, S., & Djadid, N. D. (2009). Genetic mapping of the duffy binding protein (DBP) ligand domain of *Plasmodium vivax* from unstable malaria region in the Middle East. *The American journal of tropical medicine and hygiene, 80*(1), 112-118.

Bai, T., Becker, M., Gupta, A., Strike, P., Murphy, V. J., Anders, R. F., & Batchelor, A. H. (2005). Structure of AMA1 from *Plasmodium falciparum* reveals a clustering

of polymorphisms that surround a conserved hydrophobic pocket. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102*(36), 12736-12741.

Barry, A. E., Schultz, L., Buckee, C. O., & Reeder, J. C. (2009). Contrasting population structures of the genes encoding ten leading vaccine-candidate antigens of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *PLoS One, 4*(12), e8497.

Barry, A. E., Waltmann, A., Koepfli, C., Barnadas, C., & Mueller, I. (2015). Uncovering the transmission dynamics of *Plasmodium vivax* using population genetics. *Pathogens and global health, 109*(3), 142-152.

Besteiro, S., Dubremetz, J.F., and Lebrun, M. (2011). The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cell. Microbiol. 13*, 797–805.

Blackman, M. J., & Holder, A. A. (1992). Secondary processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1) by a calcium-dependent membrane-bound serine protease: shedding of MSP133 as a noncovalently associated complex with other fragments of the MSP1. *Molecular and biochemical parasitology, 50*(2), 307-315.

Blackman, M. J., Heidrich, H. G., Donachie, S., McBride, J. S., & Holder, A. A. (1990). A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *Journal of Experimental Medicine, 172*(1), 379-382.

Bousema, T., Okell, L., Felger, I., Drakeley, C. (2014). Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nature Reviews Microbiology* 1-8.

Caraballo, J. R., Delgado, G., Rodriguez, R., & Patarroyo, M. A. (2007). The antigenicity of a *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein-1 (PvRBP1) recombinant fragment in humans and its immunogenicity and protection studies in Aotus monkeys. *Vaccine, 25*(18), 3713-3721.

Carvalho, T. A., Queiroz, M. G., Cardoso, G. L., Diniz, I. G., Silva, A. N., Pinto, A.Y., Guerreiro, J. F. (2012). *Plasmodium vivax* infection in Anajás, State of Pará: no differential resistance profile among Duffy-negative and Duffy-positive individuals. *Malaria Journal 11*: 430.

Cavasini, C., Mattos, L., D`Almeida, V., Gollino, Y., Moretti, L., Bonini, C., Rossit, A., Castilho, L., Machado, R. (2007). Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. *Malaria Journal 6*: 167.

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. (2017). Biology of Malaria. Centers for Disease Control and Prevention. Recuperado de https://www.cdc.gov/malaria/

Chitnis, C. E., & Sharma, A. (2008). Targeting the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. *Trends in parasitology*, *24*(1), 29-34.

Chootong, P., Ntumngia, F. B., VanBuskirk, K. M., Xainli, J., Cole-Tobian, J. L., Campbell, C. O., Fraser, T. S., King, C. L., & Adams, J. H. (2010). Mapping epitopes of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein with naturally acquired inhibitory antibodies. *Infection and immunity*, *78*(3), 1089-1095.

Cole-Tobian, J., King, C. H. L. (2003). Diversity and natural selection in *Plasmodium vivax* Duffy binding protein gene. *Mol Biochem Parasitol 127*: 121–132.

De Sousa, T. N., Carvalho, L. H., & de Brito, C. F. A. (2011). Worldwide genetic variability of the Duffy binding protein: insights into *Plasmodium vivax* vaccine development. *PLoS One*, *6*(8), e22944.

Dias, S., Somarathna, M., Manamperi, A., Escalante, A. A., Gunasekera, A. M., & Udagama, P. V. (2011). Evaluation of the genetic diversity of domain II of *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 (PvAMA-1) and the ensuing strain-specific immune responses in patients from Sri Lanka. *Vaccine*, *29*(43), 7491-7504.

Dluzewski, A. R., Ling, I. T., Hopkins, J. M., Grainger, M., Margos, G., Mitchell, G. H., Holder, A. A., & Bannister, L. H. (2008). Formation of the food vacuole in *Plasmodium falciparum*: a potential role for the 19 kDa fragment of merozoite surface protein 1 (MSP119). *PLoS One*, *3*(8), e3085.

Dvorin, J. D., Martyn, D. C., Patel, S. D., Grimley, J. S., Collins, C. R., Hopp, C. S., & Baker, D. A. (2010). A plant-like kinase in *Plasmodium falciparum* regulates parasite egress from erythrocytes. *Science*, *328*(5980), 910-912.

Egan, A.F., Burghaus, P., Druilhe, P., Holder, A. A., Riley, E. M. (1999). Human antibodies to the 19kDa C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum*

merozoite surface protein 1 inhibit parasite growth in vitro. *Parasite Immunology, 21*(3), 133-139.

Escalante, A. A., Cornejo, O. E., Rojas, A., Udhayakumar, V., & Lal, A. A. (2004). Assessing the effect of natural selection in malaria parasites. *Trends in parasitology, 20*(8), 388-395.

Escalante, A. A., Grebert, H. M., Chaiyaroj, S. C., Magris, M., Biswas, S., Nahlen, B. L., & Lal, A. A. (2001). Polymorphism in the gene encoding the apical membrane antigen-1 (AMA-1) of *Plasmodium falciparum*. X. Asembo Bay Cohort Project. *Molecular and biochemical parasitology, 113*(2), 279-287.

Fernandez-Becerra, C., Sanz, S., Brucet, M., Stanisic, D. I., Alves, F. P., Camargo, E. P., Alonso, P. L., Mueller, I., & del Portillo, H. A. (2010). Naturally-acquired humoral immune responses against the N-and C-termini of the *Plasmodium vivax* MSP1 protein in endemic regions of Brazil and Papua New Guinea using a multiplex assay. *Malaria journal, 9*(1), 29.

Ferreira, A. R., Singh, B., Cabrera-Mora, M., De Souza, A. C. M., Marques, M. T. Q., Porto, L. C. S., Santos, F., Banic, D. M., Calvo-Calle, J. M., Oliveira-Ferreira, J., & Moreno, A. (2014). Evaluation of naturally acquired IgG antibodies to a chimeric and non-chimeric recombinant species of *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein-1: lack of association with HLA-DRB1*/DQB1* in malaria exposed individuals from the Brazilian Amazon. *PloS one, 9*(8), e105828.

Futuyma, D. J. (2013). *Evolution*. 3ra edición. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.

Galinski, M. R., Medina, C. C., Ingravallo, P., & Barnwell, J. W. (1992). A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites. *Cell, 69*(7), 1213-1226.

Gentil, F., Bargieri, D. Y., Leite, J. A., Francoso, K. S., Patricio, M. B., Espindola, N. M., Vaz, A. J., Palatnik-de-Sousa, C. B., Rodrigues, M. M., Costa, F. T. M., & Soares, I. S. (2010). A recombinant vaccine based on domain II of *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 induces high antibody titres in mice. *Vaccine, 28*(38), 6183-6190.

Gilson, P. R., Nebl, T., Vukcevic, D., Moritz, R. L., Sargeant, T., Speed, T. P., Schofield, L., & Crabb, B. S. (2006). Identification and stoichiometry of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular & cellular proteomics, 5*(7), 1286-1299.

González-Cerón, L., Cerritos, R., Corzo-Mancilla, J., & 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), 651.

Gosi, P., Khusmith, S., Khalambaheti, T., Lanar, D. E., Schaecher, K. E., Fukuda, M. M., & Miller, S. R. (2008). Polymorphism patterns in Duffy-binding protein among Thai *Plasmodium vivax* isolates. *Malaria journal*, *7*(1), 112.

Grimberg, B.T., Udomsangpetch, R., Xainli, J., McHenry, A., Panichakul, T., Sattabongkot, J. (2007). *Plasmodium vivax* invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy Binding Protein. *PLoS Med 4*(12): 337.

Gunasekera, A. M., Wickramarachchi, T., Neafsey, D. E., Ganguli, I., Perera, L., Premaratne, P. H., Hartl, D., Handunnetti, S. M., Udagama-Randeniya, P. V., & 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.

Han, J. H., Lee, S. K., Wang, B., Muh, F., Nyunt, M. H., Na, S., Ha, K. S., Hong, S. H., Park, W. S., Sattabongkot, J., & Tsuboi, T. (2016). Identification of a reticulocyte-specific binding domain of *Plasmodium vivax* reticulocyte-binding protein 1 that is homologous to the PfRh4 erythrocyte-binding domain. *Scientific reports*, *6*, 26993.

Huaman, M. C., Martin, L. B., Malkin, E., Narum, D. L., Miller, L. H., Mahanty, S., & Long, C. A. (2008). Ex vivo cytokine and memory T cell responses to the 42-kDa fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in vaccinated volunteers. *The Journal of Immunology*, *180*(3), 1451-1461.

Imwong, M., Nair, S., Pukrittayakamee, S., Sudimack, D., Williams, J. T., Mayxay, M., Newton, P. N., Kim, J. R., Nandy, A., Osorio, L., & Carlton, J. M. (2007). Contrasting genetic structure in *Plasmodium vivax* populations from Asia and South America. *International journal for parasitology*, *37*(8), 1013-1022.

John, C. C., O'Donnell, R. A., Sumba, P. O., Moormann, A. M., de Koning-Ward, T. F., King, C. L., Kazura, J. W., & Crabb, B. S. (2004). Evidence that invasion-inhibitory antibodies specific for the 19-kDa fragment of merozoite surface protein-1 (MSP-119) can play a protective role against blood-stage *Plasmodium falciparum* infection in individuals in a malaria endemic area of Africa. *The Journal of Immunology*, *173*(1), 666-672.

Ju, H. L., Kang, J. M., Moon, S. U., Bahk, Y. Y., Cho, P. Y., Sohn, W. M., Park, Y. K., Park, J. W., Kim, T. S., & Na, B. K. (2013). Genetic diversity and natural selection of Duffy binding protein of *Plasmodium vivax* Korean isolates. *Acta tropica*, *125*(1), 67-74.

Ju, H. L., Kang, J. M., Moon, S. U., Kim, J. Y., Lee, H. W., Lin, K., Sohn, W. M., Lee, J. S., Kim, T. S., & Na, B. K. (2012). Genetic polymorphism and natural selection of Duffy binding protein of *Plasmodium vivax* Myanmar isolates. *Malaria journal*, *11*(1), 60.

Kang, J. M., Ju, H. L., Kang, Y. M., Lee, D. H., Moon, S. U., Sohn, W. M., Park, J. W., Kim, T. S., & Na, B. K. (2012). Genetic polymorphism and natural selection in the C-terminal 42 kDa region of merozoite surface protein-1 among *Plasmodium vivax* Korean isolates. *Malaria journal*, *11*(1), 206.

Kang, J. M., Lee, J., Cho, P. Y., Moon, S. U., Ju, H. L., Ahn, S. K., Sohn, W. M., Lee, H. W., Kim, T. S., & Na, B. K. (2015). Population genetic structure and natural selection of apical membrane antigen-1 in *Plasmodium vivax* Korean isolates. *Malaria journal*, *14*(1), 455.

King, C. L., Michon, P., Shakri, A. R., Marcotty, A., Stanisic, D., Zimmerman, P. A., Cole-Tobian, J. L., Mueller, I., & Chitnis, C. E. (2008). Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(24), 8363-8368.

Kocken, C. H., Withers-Martinez, C., Dubbeld, M. A., Van Der Wel, A., Hackett, F., Blackman, M. J., & Thomas, A. W. (2002). High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion. *Infection and immunity*, *70*(8), 4471-4476.

Krotoski, W. A. (1989). The hypnozoite and malarial relapse. *Prog Clin Parasitol 1*:1–19.

Krotoski, W. A., Collins, W. E., Bray, R. S., Garnham, P. C. C., Cogswell, F. B., Gwadz, R. W., Kendrick-Killick, R., Wolf, R., Sinden, R., Koontz, L. C., & Stanfill, P. S. (1982). Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *31*(6), 1291-1293.

Laishram, D. D., Sutton, P. L., Nanda, N., Sharma, V. L., Sobti, R. C., Carlton, J. M., Joshi, H. (2012). The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. *Malaria Journal 11*: 29.

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

Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics 25*, 1451–1452.

Lin, C. S., Uboldi, A. D., Epp, C., Bujard, H., Tsuboi, T., Czabotar, P. E., & Cowman, A. F. (2016). Multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 complexes mediate merozoite binding to human erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry, 291*(14), 7703-7715.

Martinez, P., Suarez, C. F., Cardenas, P. P., & Patarroyo, M. A. (2004). *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: a modular evolutionary proposal. *Parasitology, 128*(4), 353-366.

McHenry, A. M., Barnes, S. J., Ntumngia, F. B., King, C. L., & Adams, J. H. (2011). Determination of the molecular basis for a limited dimorphism, N417K, in the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. *PLoS One, 6*(5), e20192.

McKenzie, F. E., Jeffery, G. M., & Collins, W. E. (2007). Gametocytemia and fever in human malaria infections. *Journal of Parasitology, 93*(3), 627-633.

Ménard, D., Barnadas, C., Bouchier, C., Henry-Halldin, C., Gray, L. R., Ratsimbasoa, A., Thonier, V., Carod, J. F., Domarle, O., Colin, Y., & Bertrand, O. (2010). *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 107*(13), 5967-5971.

Mendis, K., Sina, B. J., Marchesini, P., & Carter, R. (2001). The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene, 64*(1_suppl), 97-106.

Meyer, E. V., Semenya, A. A., Okenu, D. M., Dluzewski, A. R., Bannister, L. H., Barnwell, J. W., & Galinski, M. R. (2009). The reticulocyte binding-like proteins of *P. knowlesi* locate to the micronemes of merozoites and define two new

members of this invasion ligand family. *Molecular and biochemical parasitology*, *165*(2), 111-121.

Michon, P., Fraser, T., & Adams, J. H. (2000). Naturally Acquired and Vaccine-Elicited Antibodies Block Erythrocyte Cytoadherence of the *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein. *Infection and immunity*, *68*(6), 3164-3171

Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP). (2016). Gaceta Epidemiológica de Malaria SE-51. Recuperado de http://www.salud.gob.ec/malaria/

Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP). (2017). Gaceta Epidemiológica de Malaria SE-50. Recuperado de http://www.salud.gob.ec/malaria/

Montoya, A. E., Menco, J., Osorio, N., Zuluaga, M. A., Duque, J., Torres, G., & Restrepo, M. (2008). Concordancia entre gota gruesa, inmunocromatografía y reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de malaria. *SciELO Journal*, *28*.

Moreira, C. M., Abo-Shehada, M., Price, R. N., Drakeley, C. J. (2015). A systematic review of sub-microscopic *Plasmodium vivax* infection. *Malaria Journal 14*: 360.

Morrissette, N. S., & Sibley, L. D. (2002). Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiology and molecular biology reviews*, *66*(1), 21-38.

Mueller, I., Galinski, M. R., Baird, J. K., Carlton, J. M., Kochar, D. K., Alonso, P. L., & del Portillo, H. A. (2009). Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *The Lancet infectious diseases*, *9*(9), 555-566.

Múfalo, B. C., Gentil, F., Bargieri, D. Y., Costa, F. T., Rodrigues, M. M., & 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.

Narum, D. L., & Thomas, A. W. (1994). Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Molecular and biochemical parasitology*, *67*(1), 59-68.

Nicolete, V. C., Frischmann, S., Barbosa, S., King, C. L., & Ferreira, M. U. (2016). Naturally acquired binding-inhibitory antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein and clinical immunity to malaria in rural Amazonians. *The Journal of infectious diseases*, *214*(10), 1539-1546.

Okech, B. A., Corran, P. H., Todd, J., Joynson-Hicks, A., Uthaipibull, C., Egwang, T. G., Holder, A. A., & Riley, E. M. (2004). Fine specificity of serum antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein, PfMSP-119, predicts protection from malaria infection and high-density parasitemia. *Infection and immunity*, *72*(3), 1557-1567.

Ord, R. L., Tami, A., & 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.

Organización Mundial de la Salud. (2017). World Malaria Report 2017. Recuperado de http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/es/

Osier, F. H., Weedall, G. D., Verra, F., Murungi, L., Tetteh, K. K., Bull, P., Faber, B. W., Remarque, E., Thomas, A., Marsh, K., & Conway, D. J. (2010). Allelic diversity and naturally acquired allele-specific antibody responses to *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 in Kenya. *Infection and immunity*, *78*(11), 4625-4633.

Pachebat, J. A., Kadekoppala, M., Grainger, M., Dluzewski, A. R., Gunaratne, R. S., Scott-Finnigan, T. J., Ogun, S. A., Ling, I. T., Bannister, L. H., Taylor, H. M., & Mitchell, G. H. (2007). Extensive proteolytic processing of the malaria parasite merozoite surface protein 7 during biosynthesis and parasite release from erythrocytes. *Molecular and biochemical parasitology*, *151*(1), 59-69.

Pasay, M. C., Cheng, Q., Rzepczyk, C., & Saul, A. (1995). Dimorphism of the C terminus of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. *Molecular and biochemical parasitology*, *70*(1-2), 217-219.

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

Premaratne, P. H., Aravinda, B. R., Escalante, A. A., & Udagama, P. V. (2011). Genetic diversity of *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein II (PvDBPII) under unstable transmission and low intensity malaria in Sri Lanka. Infection, *Genetics and Evolution*, *11*(6), 1327-1339.

Putaporntip, C., Jongwutiwes, S., Sakihama, N., Ferreira, M. U., Kho, W. G., Kaneko, A., Kanbara, H., Hattori, T., & Tanabe, K. (2002). Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(25), 16348-16353.

Riglar, D. T., Richard, D., Wilson, D. W., Boyle, M. J., Dekiwadia, C., Turnbull, L., Angrisano, F., Marapana, D. S., Rogers, K. L., Whitchurch, C. B. & Beeson, J. G. (2011). Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Cell host & microbe*, *9*(1), 9-20.

Sachdeva, S., Ahmad, G., Malhotra, P., Mukherjee, P., & Chauhan, V. S. (2004). Comparison of immunogenicities of recombinant *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 19-and 42-kiloDalton fragments expressed in *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, *72*(10), 5775-5782.

Sáenz, F. E., Arévalo-Cortés, A., Valenzuela, G., Vallejo, A. F., Castellanos, A., Poveda-Loayza, A. C., Gutierrez, J. B., Alvarez, A., Yan, Y. H., Benavides, Y., & Castro, L. E. (2017). Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the northern coast of Ecuador: high prevalence of asymptomatic infections. *Malaria journal*, *16*(1), 300.

Schmidt, G. D., & Roberts, L. S. (2000). *Foundations of Parasitology* (Sixth ed.). McGraw-Hill, Ed.) United States of America.

Schousboe, M. L., Ranjitkar, S., Rajakaruna, R. S., Amerasinghe, P. H., Konradsen, F., Morales, F., Ord, R., Pearce, R., Leslie, T., Rowland, M., & Gadalla, N. (2014). Global and local genetic diversity at two microsatellite loci in *Plasmodium vivax* parasites from Asia, Africa and South America. *Malaria journal*, *13*(1), 392.

Servicio Nacional de Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores Artrópodos. (2014). Datos reportados por el SNEM.

Singh, A. P., Puri, S. K., & Chitnis, C. E. (2002). Antibodies raised against receptor-binding domain of *Plasmodium knowlesi* Duffy binding protein inhibit erythrocyte invasion. *Molecular and biochemical parasitology*, *121*(1), 21-31.

Singh, S. K., Hora, R., Belrhali, H., Chitnis, C. E., & Sharma, A. (2006). Structural basis for Duffy recognition by the malaria parasite Duffy-binding-like domain. *Nature*, *439*(7077), 741-744.

Sinka, M. E., Bangs, M. J., Manguin, S., Rubio-Palis, Y., Chareonviriyaphap, T., Coetzee, M., Mbogo, C. M., Heminway, J., Patil, A. P., Temperley, W. H., & Gething, P. W. (2012). A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & vectors*, *5*(1), 69.

Soares, I. S., Barnwell, J. W., Ferreira, M. U., Da Cunha, M. G., Laurino, J. P., Castilho, B. A., & Rodrigues, M. M. (1999). A *Plasmodium vivax* vaccine candidate displays limited allele polymorphism, which does not restrict recognition by antibodies. *Molecular medicine*, *5*(7), 459.

Sousa, T. N., Tarazona-Santos, E. M., Wilson, D. J., Madureira, A. P., Falcão, P. R., Fontes, C. J., Gil, L. H., Ferreira, M. U., Carvalho, L. H., & Brito, C. F. (2010). Genetic variability and natural selection at the ligand domain of the Duffy binding protein in Brazilian *Plasmodium vivax* populations. *Malaria journal, 9*(1), 334.

Souza-Silva, F. A., da Silva-Nunes, M., Sanchez, B. A., Ceravolo, I. P., Malafronte, R. S., Brito, C. F., Ferreira, M. U., & Carvalho, L. H. (2010). Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (DBP) in rural Brazilian Amazon. *The American journal of tropical medicine and hygiene, 82*(2), 185-193.

Srinivasan, P., Beatty, W. L., Diouf, A., Herrera, R., Ambroggio, X., Moch, J. K., & Haynes, J. D. (2011). Binding of *Plasmodium* merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(32), 13275-13280.

Stafford, W. H., Günder, B., Harris, A., Heidrich, H. G., Holder, A. A., & Blackman, M. J. (1996). A 22 kDa protein associated with the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 complex. *Molecular and biochemical parasitology*, *80*(2), 159-169.

Trucco, C., Fernandez-Reyes, D., Howell, S., Stafford, W. H., Scott-Finnigan, T. J., Grainger, M., Ogun, S. A., Taylor, W. R., & Holder, A. A. (2001). The merozoite surface protein 6 gene codes for a 36 kDa protein associated with the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 complex. *Molecular and biochemical parasitology, 112*(1), 91-101.

Udagama, P. V., Atkinson, C. T., Peiris, J. S., David, P. H., Mendis, K. N., & Aikawa, M. (1988). Immunoelectron microscopy of Schüffner's dots in *Plasmodium vivax*-infected human erythrocytes. *The American journal of pathology, 131*(1), 48.

Valizadeh, V., Zakeri, S., Mehrizi, A. A., & Djadid, N. D. (2014). Population genetics and natural selection in the gene encoding the Duffy binding protein II in Iranian *Plasmodium vivax* wild isolates. *Infection, Genetics and Evolution, 21*, 424-435.

VanBuskirk, K. M., Tobian, J. L. C., Baisor, M., Sevova, E. S., Bockarie, M., King, C. L., & Adams, J. H. (2004). Antigenic drift in the ligand domain of *Plasmodium*

vivax duffy binding protein confers resistance to inhibitory antibodies. *Journal of Infectious Diseases, 190*(9), 1556-1562.

Vélez-Álvarez, E. (2015). Caracterización poblacional de *Plasmodium vivax* en Ecuador mediante microsatélites y análisis de resistenecia de genes de resistencia frente a antimaláricos. (Disertación de pregrado). ESPE. Universidad de las Fuerzas Armadas, Quito, Ecuador.

Veloz-Haro, E. (2015). Duffy blood group phenotypes/genotypes and their association with malaria prevalence in four communities of northwest Ecuador. (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Weiss, G. E., Gilson, P. R., Taechalertpaisarn, T., Tham, W. H., de Jong, N. W., Harvey, K. L., Fowkes, F. J. I., Rayner, J. C., Wright, G. J., & Cowman, A. F. (2015). Revealing the sequence and resulting cellular morphology of receptor-ligand interactions during *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *PLoS pathogens, 11*(2), e1004670.

Woldearegai, T. G., Kremsner, P. G., Kun, J. F., & Mordmüller, B. (2013). *Plasmodium vivax* malaria in Duffy-negative individuals from Ethiopia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 107*(5), 328-331.

Zakeri, S., Sadeghi, H., Mehrizi, A. A., & 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.

Zeyrek, F. Y., Tachibana, S. I., Yuksel, F., Doni, N., Palacpac, N., Arisue, N., Horii, T., Coban, C., & Tanabe, K. (2010). Limited polymorphism of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 gene in isolates from Turkey. *The American journal of tropical medicine and hygiene, 83*(6), 1230-1237.

10. FIGURAS

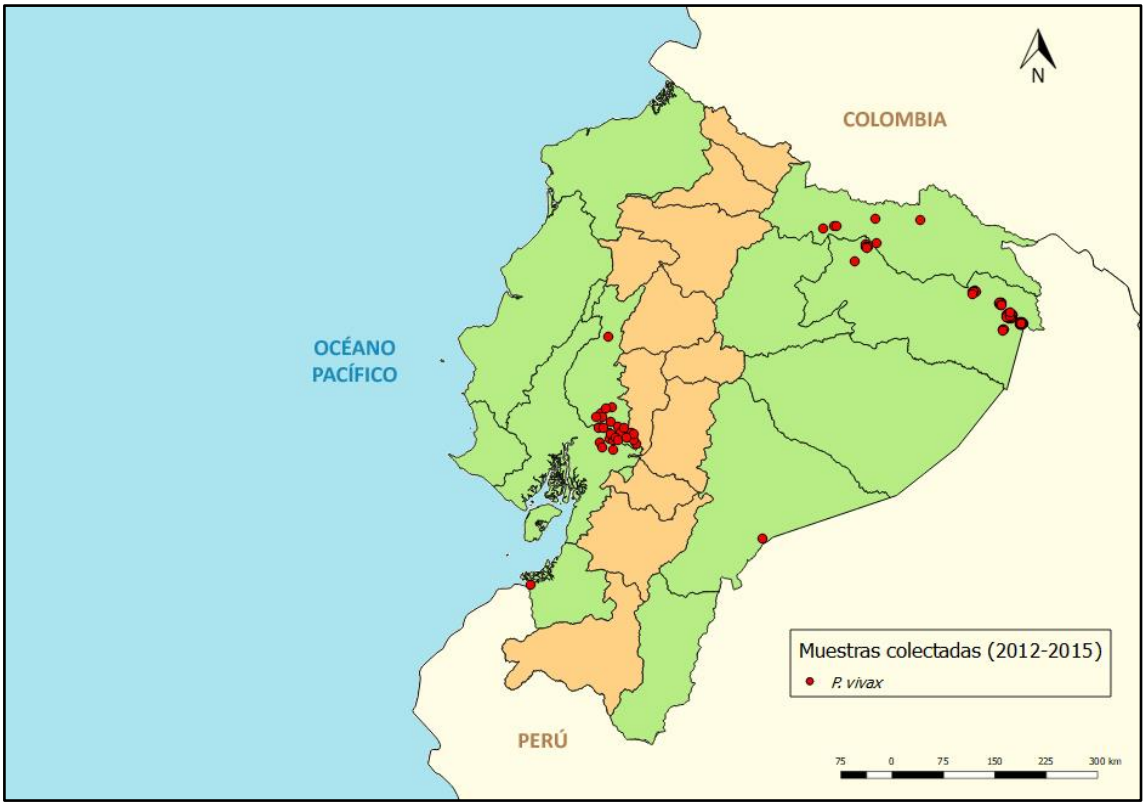


Figura 1. Distribución geográfica de muestras colectadas. Localización de las 91 muestras de *P. vivax* recolectadas por personal del SNEM entre el año 2012 – 2015. Las muestras obtenidas en la Región Amazónica (N=64) pertenecieron a las provincias de Sucumbíos, Orellana y Morona Santiago; mientras que las de la Costa (N=27) provenían de El Oro, Guayas y Los Ríos.

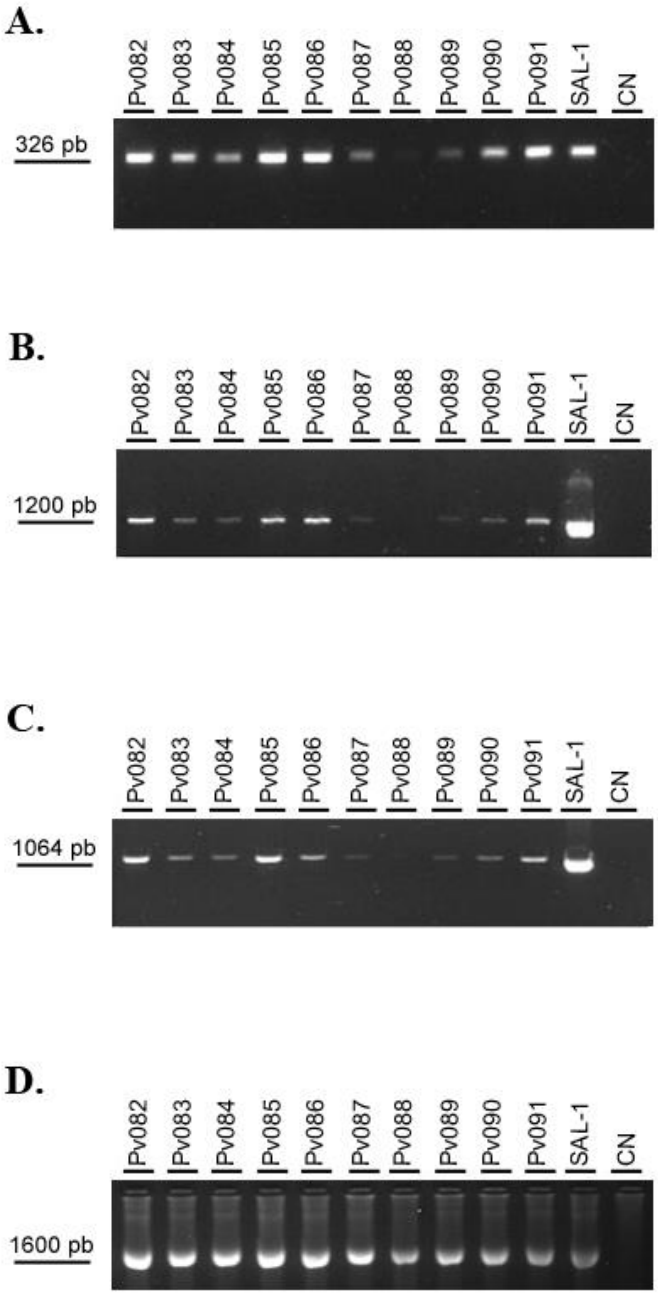


Figura 2. Geles representativos de los productos amplificados. Se muestran cuatro fragmentos de geles de agarosa con las muestras Pv082 – Pv091, además del control positivo (SAL-1) y el control negativo (CN). A) Gel perteneciente al gen *Pvmsp1-19* B) Gel perteneciente al gen *PvdbpII* C) Gel perteneciente al gen *Pvrbp1a-2* D) Gel perteneciente al gen *Pvama1*.

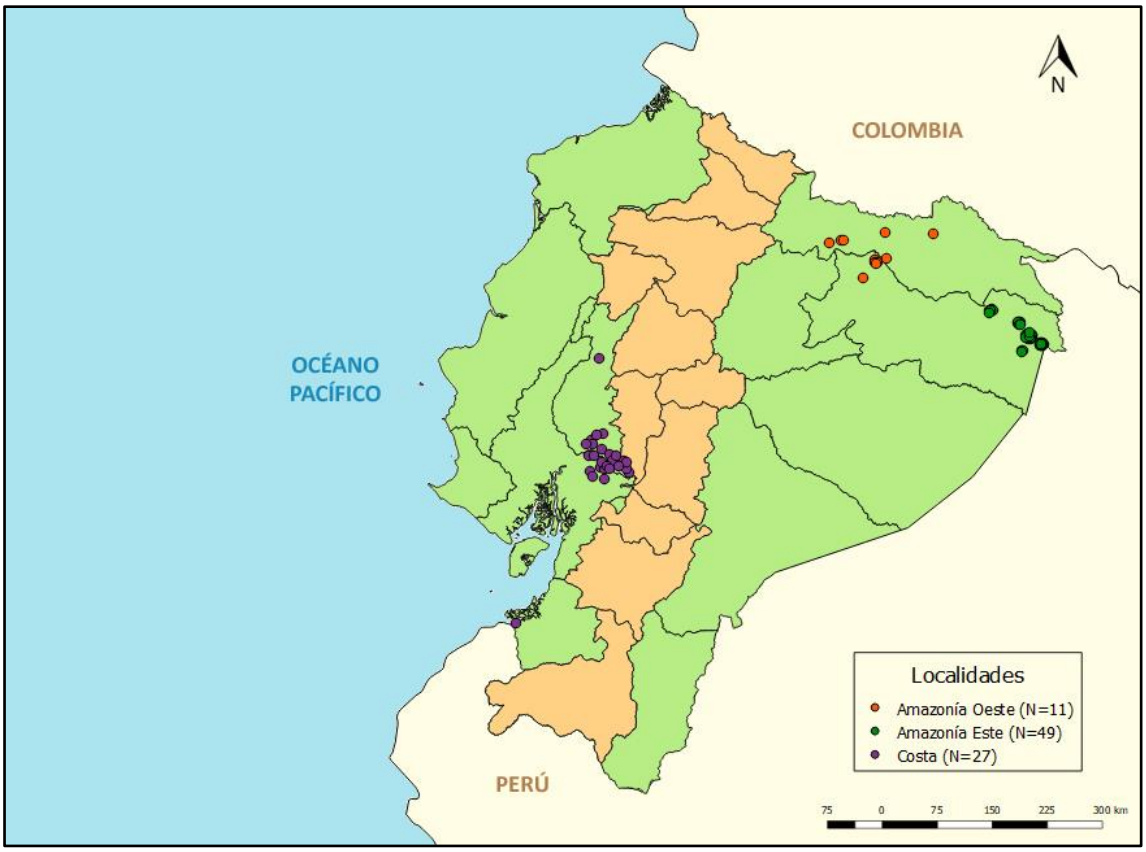


Figura 3. Distribución geográfica de las localidades asignadas para el estudio. Se utilizó un total de 87 muestras de *P. vivax*; y se las designó una localidad dependiendo de su ubicación. Amazonía Este (Verde), Amazonía Oeste (Naranja) y Costa (Morado).



Figura 4. Alineamiento de *Pvmsp1-19*. Se muestra un fragmento de 83 pb del alineamiento de 32 secuencias de *P. viva*x ecuatorianos comparados con la secuencia de referencia PVX_099980 (SAL-1).

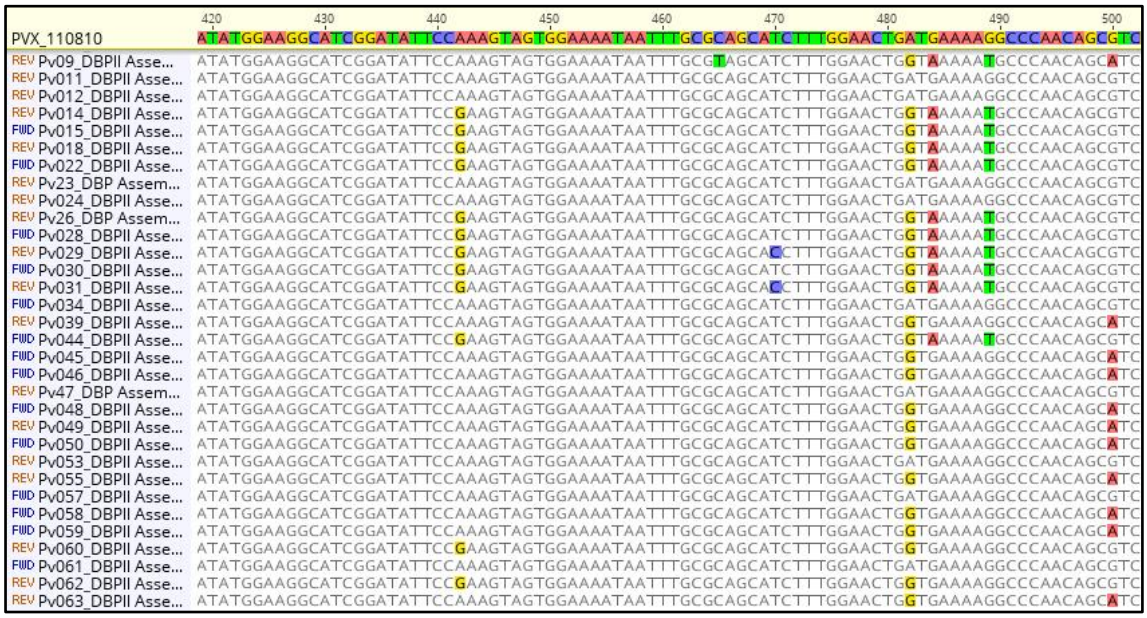


Figura 5. Alineamiento de *PvdbpII*. Se muestra un fragmento de 83 pb del alineamiento de 32 secuencias de *P. viva*x ecuatorianos comparados con la secuencia de referencia PVX_110810 (SAL-1). Los nucleótidos señalados con distintos colores corresponden a polimorfismos.

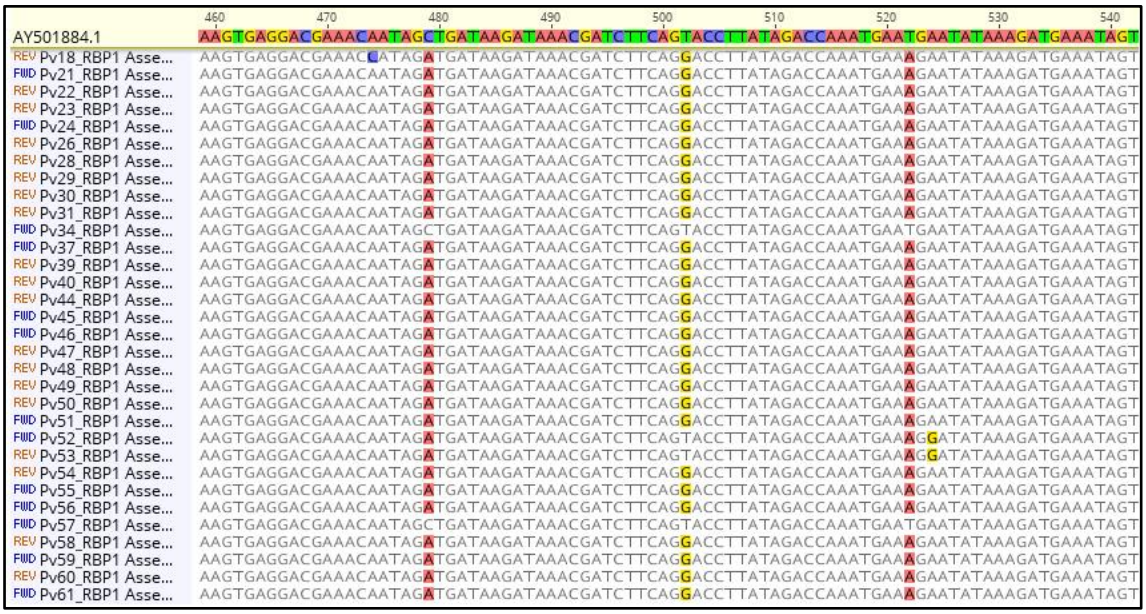


Figura 6. Alineamiento de *Pvrbp1a-2*. Se muestra un fragmento de 83 pb del alineamiento de 32 secuencias de *P. vivax* ecuatorianos comparados con la secuencia de referencia AY501884 (SAL-1). Los nucleótidos señalados con distintos colores corresponden a polimorfismos.

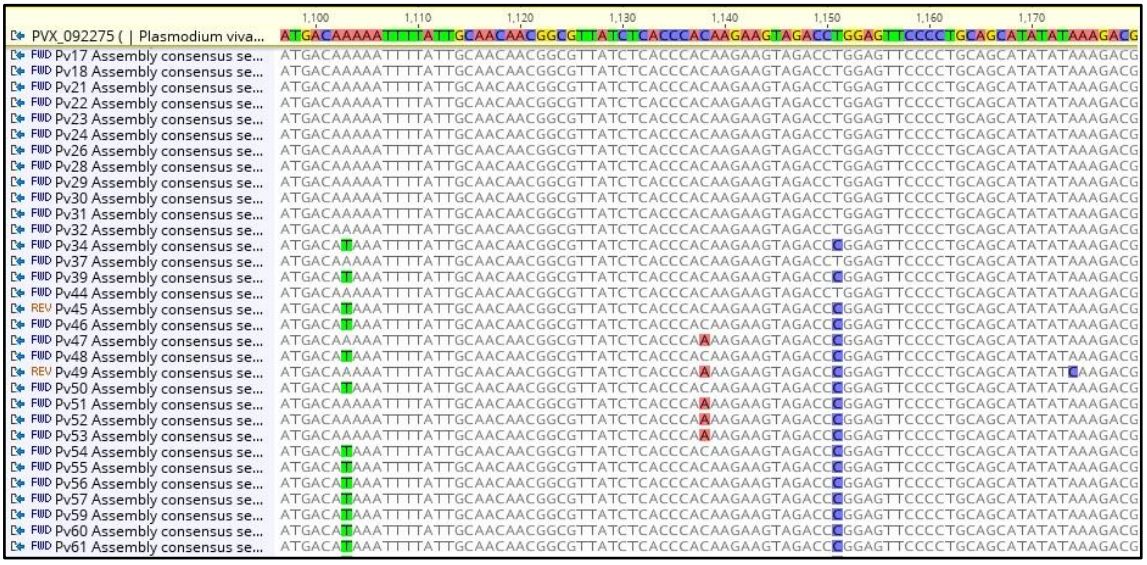


Figura 7. Alineamiento de *Pvama1*. Se muestra un fragmento de 83 pb del alineamiento de 32 secuencias de *P. vivax* ecuatorianos comparados con la secuencia de referencia PVX_092275 (SAL-1). Los nucleótidos señalados con distintos colores corresponden a polimorfismos.

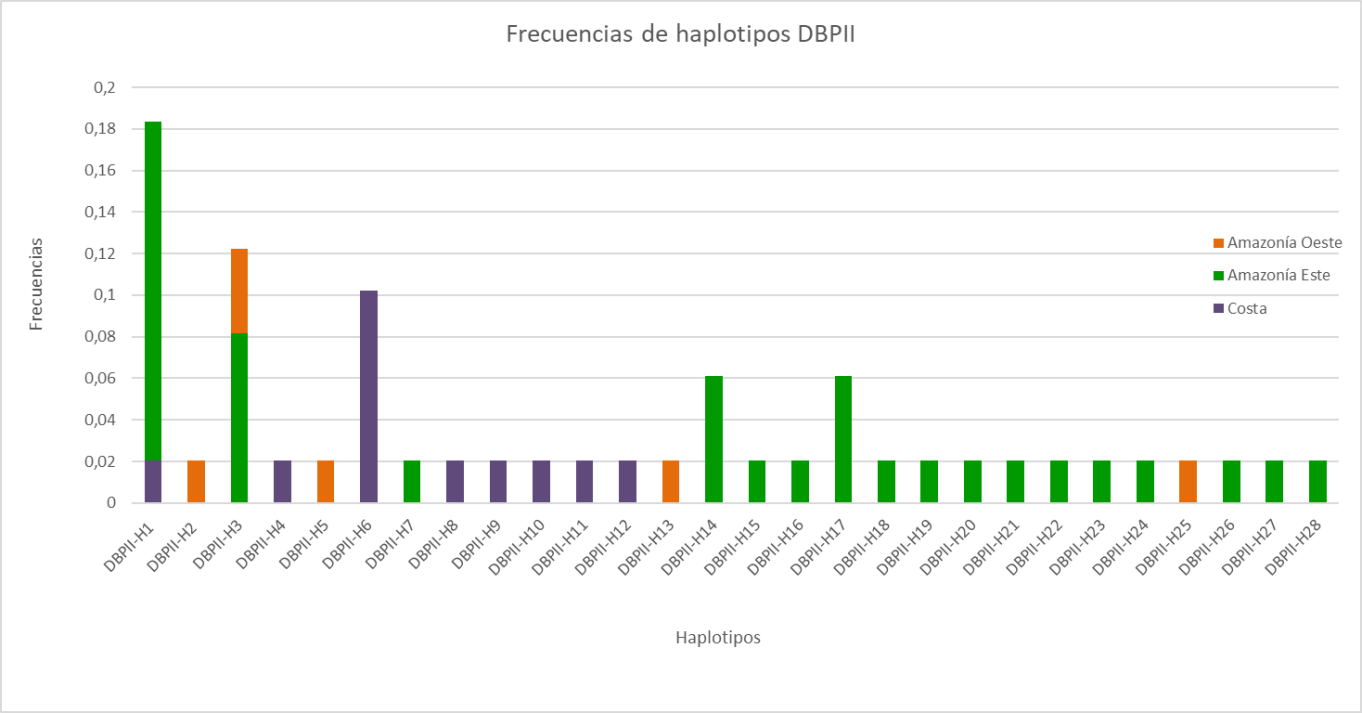


Figura 8. Frecuencias de haplotipos DBPII según localidades. Se observa que DBPII-H1 fue el haplotipo que se encontró con mayor frecuencia, y estaba presente tanto en la Amazonía Este como en la Costa. De la misma forma ocurrió con DBPII-H3, el cual fue encontrado en ambas localidades de la Amazonía (Este y Oeste). En general, se pudo ver un gran número de variantes de baja frecuencia, la mayoría pertenecientes a la Amazonía Este.

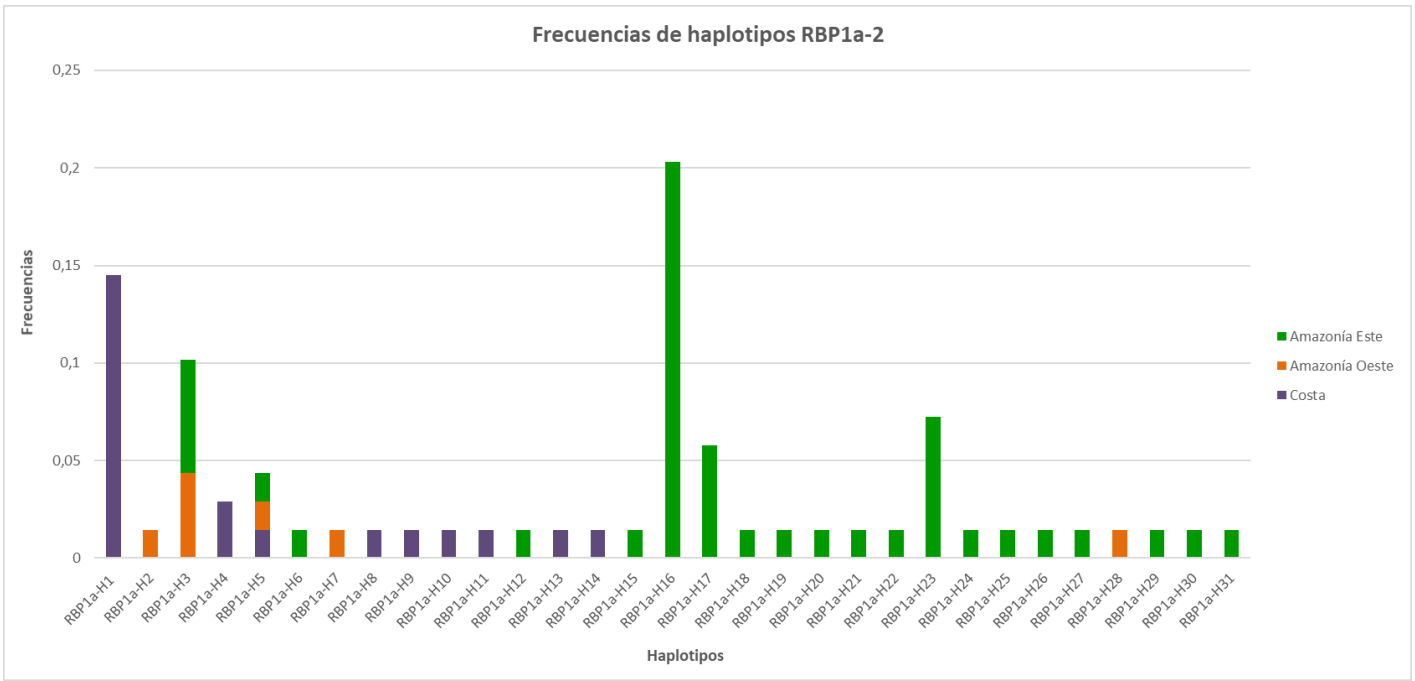


Figura 9. Frecuencias de haplotipos RBP1a-2 según localidades. Se puede observar que el haplotipo RBP1a-H16 fue el de mayor frecuencia dentro de *P. vivax* ecuatorianos. Además, RBP1a-H3 y RBP1a-H5 fueron los únicos que se encontraron compartidos entre localidades.

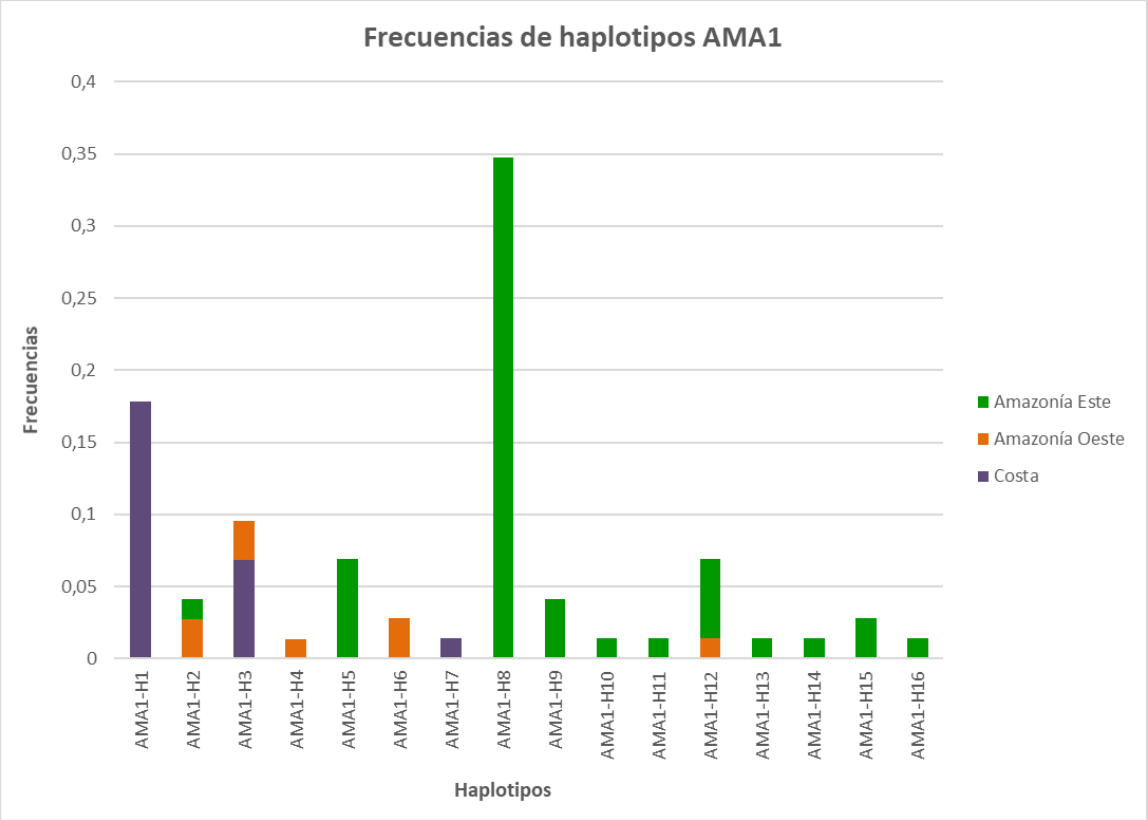


Figura 10. Frecuencias de haplotipos AMA1 según localidades. Se muestra que AMA1-H8 fue el haplotipo más frecuente dentro de la población. Adicionalmente, se encontraron tres variantes (AMA1-H2, AMA1-H3 y AMA1-H12) compartidas entre localidades. Por otra parte, se evidenció que para *Pvama1* la cantidad de haplotipos generados fue mucho menor con respecto a los otros genes analizados.

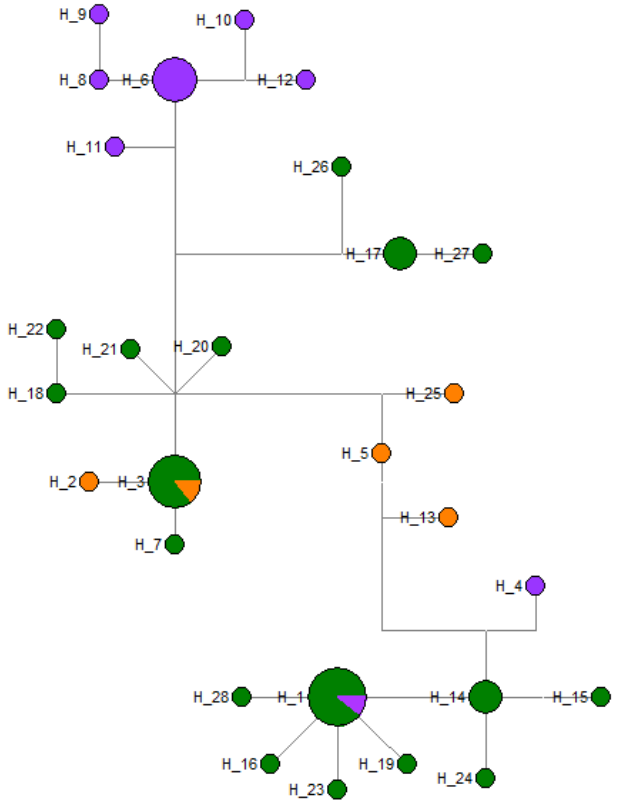


Figura 11. Red de haplotipos de *PvdbpII*. La imagen muestra la relación genética entre los haplotipos encontrados según su lugar de origen: Amazonía Este (verde), Amazonía Oeste (naranja) y Costa (morado)**.** La mayoría de los haplotipos mostraron similitud genética según la ubicación geográfica a la que pertenecían. Sin embargo, el haplotipo 4 (DBPII-H4) parecía estar más relacionado a las variantes de la Amazonía Este, a pesar de pertenecer a la localidad Costa.

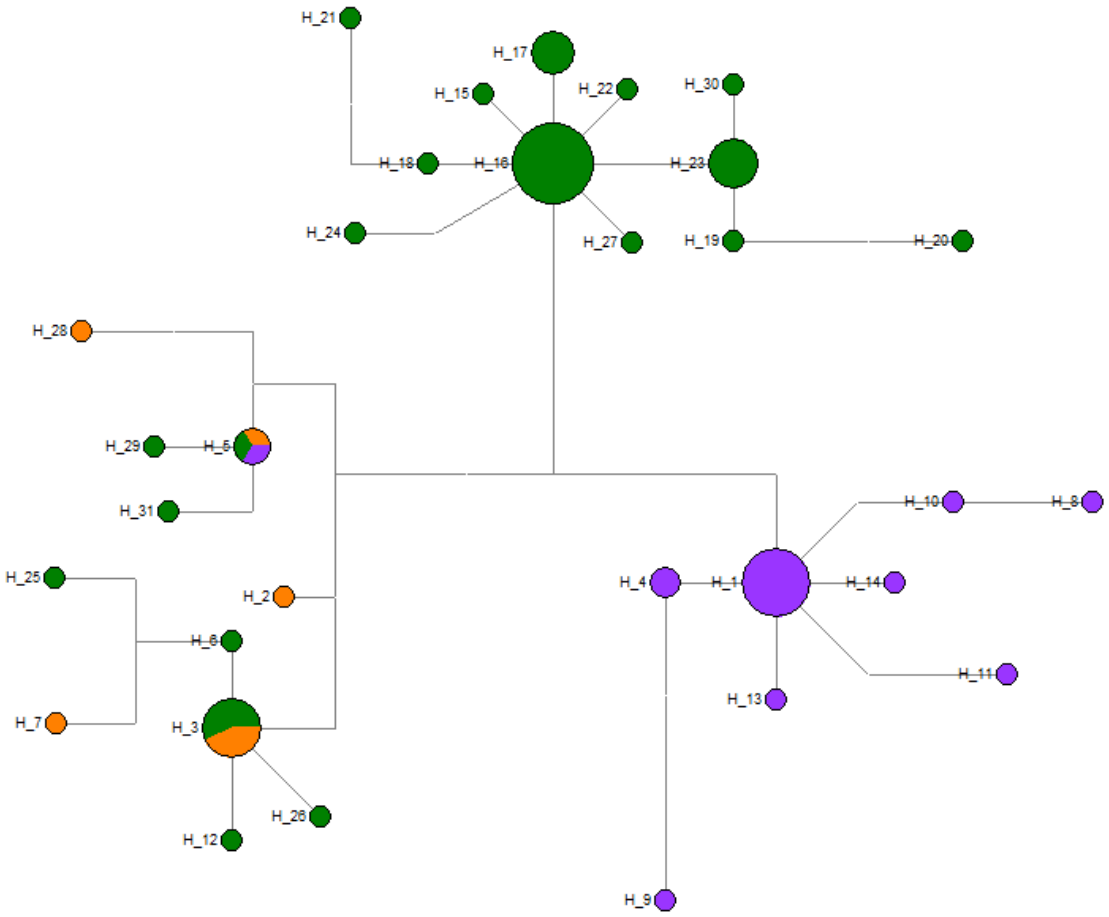


Figura 12. Red de haplotipos de *Pvrbp1a-2*. Se observa una mayor relación y entre los haplotipos conforme a la localidad a la cual pertenecen. Los haplotipos pertenecientes a la Amazonía Este (verde) se agruparon entre sí en la parte superior; y se encontraban más distanciados que los pertenecientes a la localidad Costa (morado), ubicados en la parte inferior derecha. Además, se vio que las variantes de la Amazonía Oeste (naranja) estaban más relacionadas genéticamente con ciertos haplotipos de la Amazonía Este.

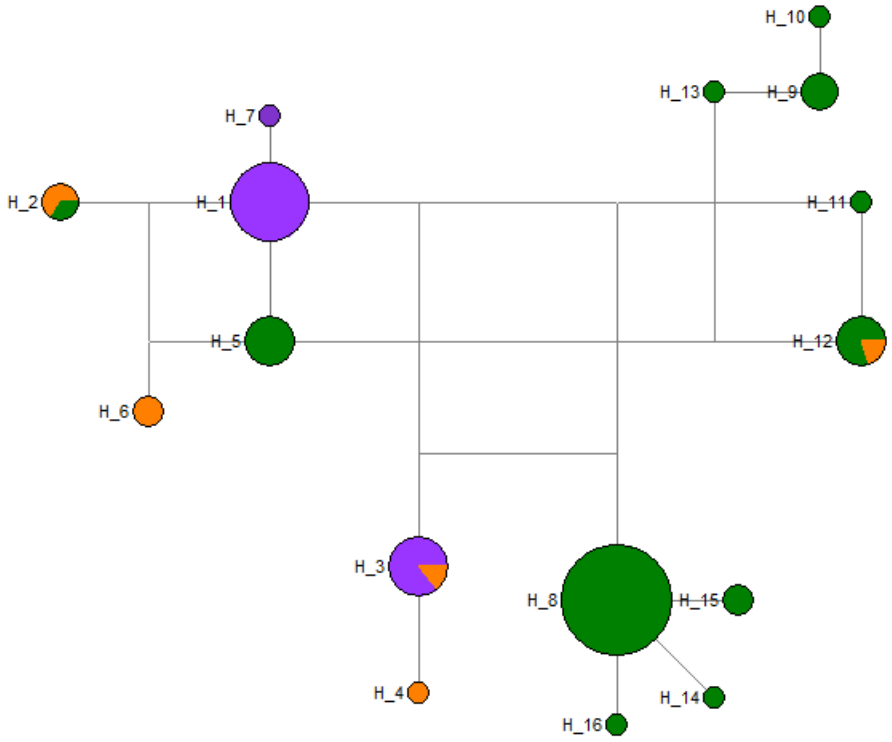


Figura 13. Red de haplotipos de *Pvama1*. Se muestra a las variantes de la Amazonía Este (verde) agrupadas hacia el lado derecho de la imagen, mostrando mayor semejanza entre ellas. AMA1-H14, AMA1-H15 y AMA1-H16 se diferenciaron, solamente en una mutación, con respecto al haplotipo AMA1-H8, el cual fue más frecuente en la población.

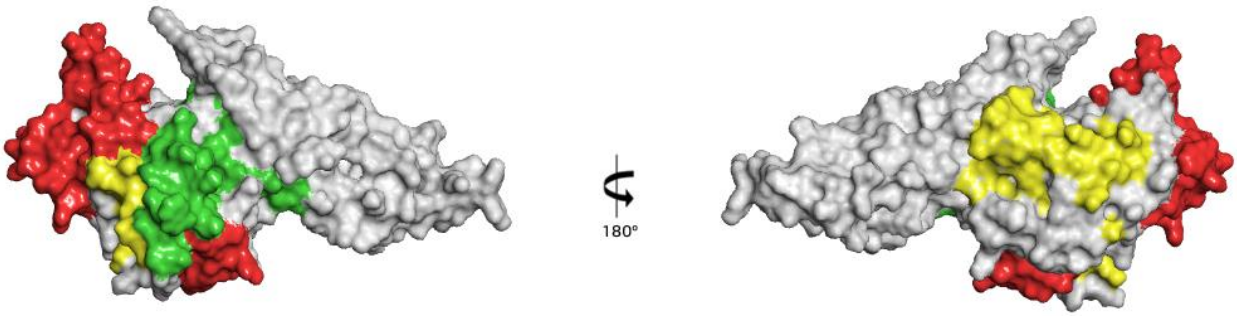


Figura 14. Epítopos presentes en la región II de PvDBP. Se muestran dos lados opuestos de la misma proteína. Los epítopos de células B de alta inhibición de unión (H), mediana inhibición (M) y baja inhibición (L) están marcados con rojo, verde y amarillo respectivamente.

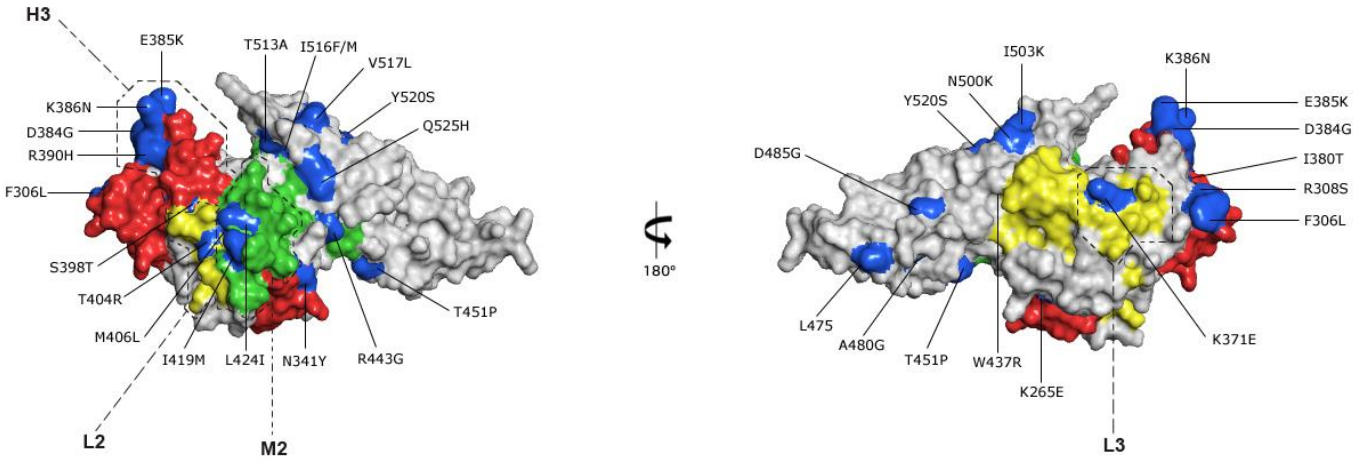


Figura 15. Ubicación de 28 residuos polimórficos presentes en la región II de la proteína PvDBP. En azul se muestran los 28 residuos polimórficos identificados en las muestras de *P. vivax* ecuatorianos; y dentro de líneas punteadas los epítopos de mayor importancia. Se pudo ver claramente que la mayoría de estas mutaciones tiende a localizarse en los epítopos de células B. Solamente pocos cambios de aminoácidos se encontraban en sitios de la región que no son considerados de importancia.

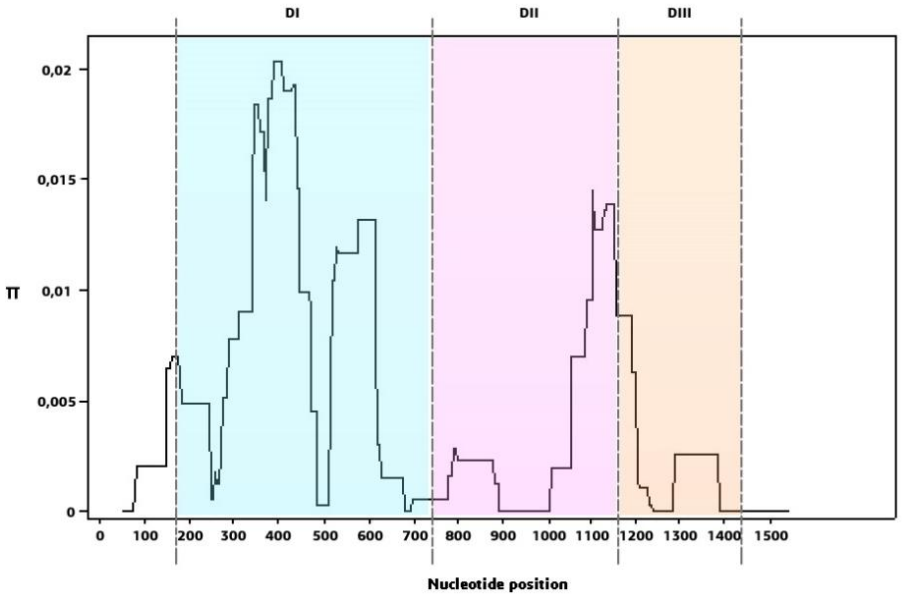


Figura 16. Representación gráfica de la diversidad nucleotídica (π) a lo largo del gen *Pvama1*. La imagen nos muestra los valores de π (eje y) con respecto a la posición nucleotídica (eje x). Los dominios están separados por líneas punteadas y diferenciados por colores: Dominio I (celeste), Dominio II (magenta) y Dominio III (naranja). Se observó que la diversidad alcanza su nivel más alto en DI, mientras que los valores más bajos correspondían al DIII.

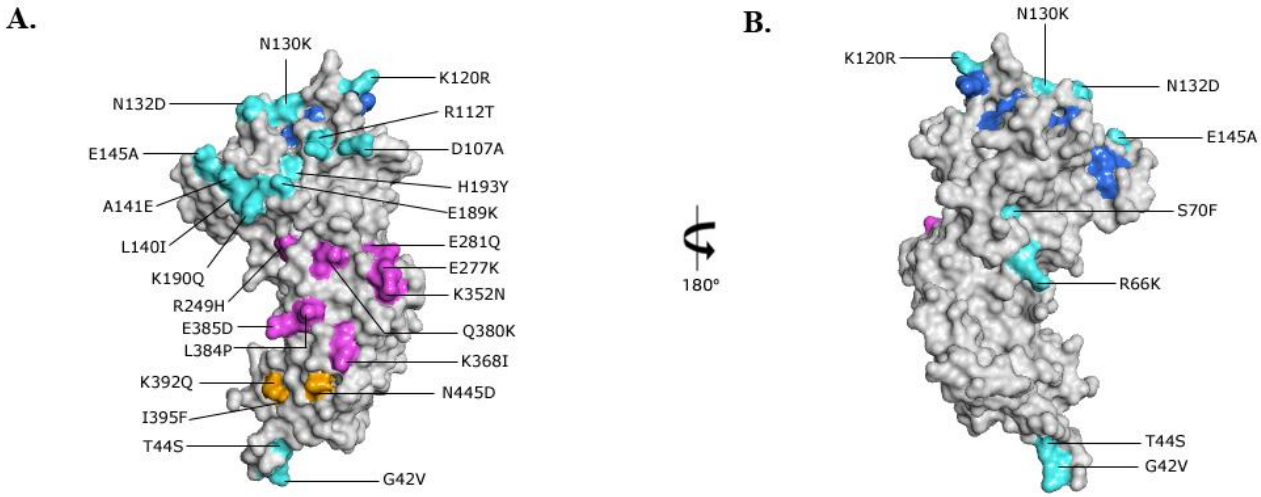


Figura 17. Localización de los 26 residuos polimórficos en PvAMA1. A) Representación de la "cara activa" de la proteína PvAMA1. Residuos polimórficos en DI de color celeste, en DII con color magenta y en DIII con naranja. B) Representación de la "cara silenciosa" de PvAMA1. Los residuos de unión con el ligando hidrófobo se muestran en azul oscuro.

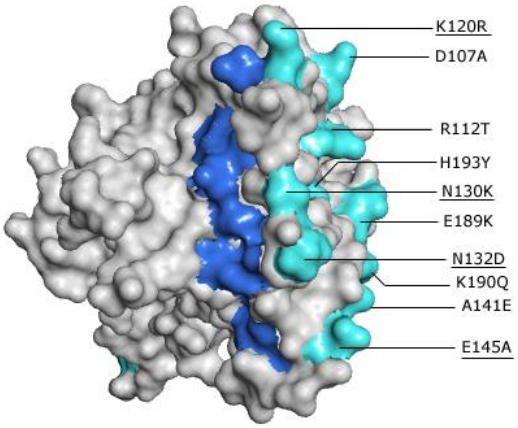


Figura 18. Ubicación de la hendidura de unión del ligando hidrófobo en la proteína PvAMA1. La imagen muestra una vista desde arriba de la proteína PvAMA1, en la que se observa la hendidura de unión del ligando hidrófobo. Los residuos de unión de dicha hendidura se muestran en azul oscuro y los residuos polimórficos presentes en DI en celeste. Además, los residuos que se localizan cerca de la hendidura; y posiblemente tienen una importancia funcional, se encuentran subrayados.

11. TABLAS

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos utilizados para la amplificación y secuenciación de los cuatro genes involucrados en la invasión de reticulocitos.

Gen	Oligonucleótidos	Secuencia (5'- 3')	Tamaño de amplicón	Fuente
Pvmsp1-19	*Pvmsp1-19F*	ATGAGCTCCGAGCACACATGTATAG	326 pb	-
	Pvmsp1-19R	ATGCACAGGAGGAAAAGCAACATG		
PvdbpII	*PvdbpIIF*	GATAAAACTGGGGAGGAAAAAGAT	1200 pb	(González-Cerón et al., 2015)
	PvdbpIIR	CTTATCGGATTTGAATTGGTGGC		
Pvrbp1a-2	*Pvrbp1a-2F*	AATACAATGCGCAAGAATTTTATATC	1064 pb	-
	Pvrbp1a-2R	GTGAAGTACACACTTGATTTCCC		
Pvama1	*Pvama1_F16*	GCGGTTACTTCCACCCC	1600 pb	(Ord et al., 2008)
	Pvama1_R613	GCGTGGTGTGGGAGGCCC		
	Pvama1_F29	GCAAACCAAATCGCTGCC		
	Pvama1_R598	GCCTCGGGGTCGAGCATCTCGTC		
	Pvama1_F142	AGAATTCCAGCTGGAAGATG		
	Pvama1_F301	CGTAAAAATTTAGGAAACGCC		
	Pvama1_F441	CCCCTGCAGCATATATAAAGAC		
	Pvama1_R138	TTCCACTTCTGCATCTTCCCC		
	Pvama1_R293	ACATTTTTGCTCAAATACACC		
	Pvama1_R442	GGGAAATCCCGGTCTACTTC		

Tabla 2. Comparación de la diversidad genética de los cuatro principales genes involucrados en la invasión de reticulocitos en *P. vivax* ecuatorianos.

Gen	S	Si	Pa	K	H	Hd (SD)	π (SD)
Pvmsp1-19 (N= 72)	1	1	0	0,028	2	0,028 (0,027)	0,00009 (0,00009)
PvdbpII (N=50)	45	26	19	6,667	28	0,940 (0,019)	0,00736 (0,00059)
Pvrbp1a-2 (N=70)	53	32	21	6,363	31	0,924 (0,018)	0,00747 (0,00075)
Pvama1 (N=73)	33	4	29	6,986	16	0,836 (0,031)	0,00439 (0,00033)

S: sitios polimórficos, Si: sitios únicos, Pa: sitios parsimónicos, K: número promedio de diferencias entre nucleótidos, H: número de haplotipos, Hd: diversidad de haplotipos, π: diversidad nucleotídica, SD: desviación estándar.

Tabla 3. Haplotipos *PvdbpII* presentes en 50 muestras de *P. vivax* ecuatorianos.

Polimorfismos *PvdbpII*		N224C	S225F	N231Y	G232G/D	T243S	T257T	K265E	F306L	R308S	N341Y	K371E	R378R	I380T
SAL-1	**AA**	N	S	N	G	T	T	K	F	R	N	K	R	I
	Nucleótido	AAT	TCT	AAT	GGT	ACG	ACT	AAG	TTT	AGG	AAC	AAA	CGC	ATC
Variación nucleótido		**TG**T	T**T**T	**T**AT	GG**A**/G**A**T	**T**CG	AC**G**	**G**AG	TT**G**	AG**T**	**T**AC	**G**AA	CG**T**	A**C**C
Haplotipos (N)														
DBPII-H1 (9)														
DBPII-H2 (1)														
DBPII-H3 (7)														
DBPII-H4 (1)						T..			..G	..T			..T	
DBPII-H5 (1)														
DBPII-H6 (5)										..T		G..		
DBPII-H7 (1)														
DBPII-H8 (1)										..T		G..		
DBPII-H9 (1)										..T		G..		
DBPII-H10 (1)										..T		G..		.C.
DBPII-H11 (1)			.T.		.A.					..T		G..		
DBPII-H12 (1)										..T		G..		.C.
DBPII-H13 (1)														
DBPII-H14 (3)														
DBPII-H15 (1)					..A									
DBPII-H16 (1)														
DBPII-H17 (3)												G..		
DBPII-H18 (1)											T..			
DBPII-H19 (1)											T..			
DBPII-H20 (1)		TG.		T..			..G	G..						
DBPII-H21 (1)														
DBPII-H22 (1)											T..			
DBPII-H23 (1)														
DBPII-H24 (1)														
DBPII-H25 (1)												G..		
DBPII-H26 (1)												G..		
DBPII-H27 (1)												G..		
DBPII-H28 (1)														

Tabla 3. (Continuación…) Haplotipos *PvdbpII* presentes en 50 muestras de *P. vivax* ecuatorianos.

Polimorfismos *PvdbpII*		D384G	E385K	K386N	R390H	S398T	A400A	T404R	M406L	N417K	I419M	L424I	W437R	R443G	T451P	I464I
SAL-1	AA	D	E	K	R	S	A	T	M	N	I	L	W	R	T	I
	Nucleótido	GAT	GAA	AAG	CGT	TCT	GCA	ACA	ATG	AAT	ATA	TTA	TGG	AGG	ACA	ATC
Variación nucleótido		G**G**T	**A**AA	AA**T**	C**A**T	**A**CT	GC**C**	A**G**A	**T**TG	AA**A**	AT**G**	**A**TA	**C**GG	**G**GG	**C**CA	ATA**A**
Haplotipos (N)																
DBPII-H1 (9)		.G.			.A.											
DBPII-H2 (1)							..C			..A		A..	C..			
DBPII-H3 (7)										..A		A..	C..			
DBPII-H4 (1)		.G.	A..	..T	.A.	A..		.G.				A..				
DBPII-H5 (1)										..A		A..				
DBPII-H6 (5)		.G.	A..	..T						..A		A..	C..			
DBPII-H7 (1)										..A		A..	C..	G..		
DBPII-H8 (1)		.G.	A..	..T						..A		A..	C..			
DBPII-H9 (1)		.G.	A..	..T						..A		A..	C..			
DBPII-H10 (1)		.G.	A..	..T			..C			..A		A..	C..			
DBPII-H11 (1)		.G.	A..	..T						..A		A..	C..			
DBPII-H12 (1)		.G.	A..	..T						..A		A..	C..		C..	
DBPII-H13 (1)																
DBPII-H14 (3)		.G.			.A.											
DBPII-H15 (1)		.G.			.A.		..C									
DBPII-H16 (1)		.G.			.A.				T..							
DBPII-H17 (3)		.G.								..A	..G	A..	C..			..A
DBPII-H18 (1)										..A		A..	C..			
DBPII-H19 (1)		.G.			.A.											
DBPII-H20 (1)										..A		A..	C..			
DBPII-H21 (1)							..C			..A		A..	C..			
DBPII-H22 (1)										..A		A..	C..			
DBPII-H23 (1)		.G.			.A.		..C									
DBPII-H24 (1)		.G.			.A.										C..	
DBPII-H25 (1)										..A		A..				
DBPII-H26 (1)		.G.					..C			..A	..G	A..	G..			..A
DBPII-H27 (1)		.G.								..A	..G	A..	G..		C..	..A
DBPII-H28 (1)		.G.			.A.											

Tabla 3. (Continuación) Haplotipos *PvdbpII* presentes en 50 muestras de *P. vivax* ecuatorianos.

Polimorfismos *PvdbpII*		L475 INSERCIÓN	V474V	P475P	A480G	D485G	N500K	I503K	T513A	A514A	I516F/M	V517L	Y520S	Q525H
SAL-1	**AA**		V	P	A	D	N	I	T	A	I	V	Y	Q
	Nucleótido		GTA	CCA	GCG	GAT	AAT	ATA	ACG	GCA	ATC	GTA	TAT	CAG
Variación nucleótido		**CTA**	GT**T**	CC**C**	G**GA**	G**GG**	AA**A**	A**A**A	**G**CG	GC**C**	**T**TC/AT**G**	**T**TA	T**C**T	CA**C**
Haplotipos (N)														
DBPII-H1 (9)								.A.						
DBPII-H2 (1)								.A.						
DBPII-H3 (7)								.A.						
DBPII-H4 (1)		CTA		..C										
DBPII-H5 (1)				..C										
DBPII-H6 (5)								.A.						
DBPII-H7 (1)								.A.						
DBPII-H8 (1)								.A.			T..			
DBPII-H9 (1)								.A.			T..	T..		
DBPII-H10 (1)			..T					.A.						
DBPII-H11 (1)				..C				.A.						
DBPII-H12 (1)								.A.					.C.	
DBPII-H13 (1)				..C	.GA	.GG			G..		..G			
DBPII-H14 (3)				..C				.A.						
DBPII-H15 (1)				..C				.A.						
DBPII-H16 (1)								.A.						
DBPII-H17 (3)														
DBPII-H18 (1)				..C				.A.						
DBPII-H19 (1)								.A.						
DBPII-H20 (1)				..C				.A.						
DBPII-H21 (1)				..C				.A.						
DBPII-H22 (1)								.A.						
DBPII-H23 (1)								.A.						
DBPII-H24 (1)				..C				.A.						
DBPII-H25 (1)				..C				.A.						
DBPII-H26 (1)				..C			..A		G..	..C				
DBPII-H27 (1)														
DBPII-H28 (1)								.A.						..C

Tabla 4. Haplotipos *Pvrbp1a-2* presentes en 70 muestras de *P. vivax* ecuatorianos.

Polimorfismos *Pvrbp1a-2*		**N352Y/H**	**L354L**	**G355G**	**I358L**	**E360K/G**	**E370E**	**S383R**	**L385F**	**D388G/E**	**K392N**	**L393F**	**E404K**	**N420N**	**Y421S**
SAL-1	**AA**	N	L	G	I	E	E	S	L	D	K	L	E	N	Y
	Nucleótido	AAC	CTA	GGT	ATT	GAA	GAA	AGT	TTA	GAT	AAA	TTA	GAA	AAC	TAC
Variación nucleótido		**T**AC/**C**AC	CT**G**	GG**G**	**C**TT	**A**AA/G**G**A	GA**G**	**C**GT	TT**T**	G**G**T/GA**A**	AA**T**	TT**T**	**A**AA	AA**T**	T**C**C
Haplotipos (N)															
RBP1a-H1 (10)													A..		
RBP1a-H2 (1)															
RBP1a-H3 (8)															
RBP1a-H4 (2)													A..		
RBP1a-H5 (3)															
RBP1a-H6 (1)															
RBP1a-H7 (1)					C..	A..									
RBP1a-H8 (1)													A..		
RBP1a-H9 (1)				..G		.G.							A..		.C.
RBP1a-H10 (1)													A..		
RBP1a-H11 (1)				..G			..G		..T	.G.			A..	..T	
RBP1a-H12 (1)															
RBP1a-H13 (1)													A..		
RBP1a-H14 (1)												..T	A..		
RBP1a-H15 (1)															
RBP1a-H16 (14)															
RBP1a-H17 (4)															
RBP1a-H18 (1)															
RBP1a-H19 (1)															
RBP1a-H20 (1)															
RBP1a-H21 (1)				..G						..A	..T				
RBP1a-H22 (1)		T..													
RBP1a-H23 (5)															
RBP1a-H24 (1)								C..							
RBP1a-H25 (1)															
RBP1a-H26 (1)				..G								..T			
RBP1a-H27 (1)				..G											
RBP1a-H28 (1)															
RBP1a-H29 (1)			..G												
RBP1a-H30 (1)		C..													
RBP1a-H31 (1)															

Tabla 4. (Continuación…) Haplotipos *Pvrbp1a-2* presentes en 70 muestras de *P. vivax* ecuatorianos.

Polimorfismos *Pvrbp1a-2*		C422G	K436N	T461S	N469D	I490I	Y491C	Q496R	I497I	T508T	A510D	K512E	Y518D	N524K	E525G
SAL-1	AA	C	K	T	N	I	Y	Q	I	T	A	K	Y	N	E
	Nucleótido	TGC	AAA	ACT	AAT	ATA	TAC	CAG	ATA	ACA	GCT	AAG	TAC	AAT	GAA
Variación nucleótido		**G**GC	AA**T**	A**G**T	**G**AT	AT**C**	T**G**C	C**G**G	AT**T**	AC**C**	G**A**T	**G**AG	**G**AC	AA**A**	G**G**A
Haplotipos (N)															
RBP1a-H1 (10)											.A.		G..	..A	
RBP1a-H2 (1)											.A.		G..	..A	
RBP1a-H3 (8)					G..		.G.				.A.		G..	..A	
RBP1a-H4 (2)											.A.		G..	..A	
RBP1a-H5 (3)															
RBP1a-H6 (1)		G..			G..		.G.				.A.		G..	..A	
RBP1a-H7 (1)		G..	..T		G..		.G.				.A.		G..	..A	
RBP1a-H8 (1)		G..								..C	.A.		G..	..A	
RBP1a-H9 (1)						..C		.G.			.A.		G..	..A	
RBP1a-H10 (1)		G..								..C	.A.		G..	..A	
RBP1a-H11 (1)											.A.		G..	..A	
RBP1a-H12 (1)					G..		.G.				.A.		G..	..A	
RBP1a-H13 (1)											.A.		G..	..A	
RBP1a-H14 (1)											.A.		G..	..A	
RBP1a-H15 (1)				.G.	G..						.A.		G..	..A	
RBP1a-H16 (14)					G..						.A.		G..	..A	
RBP1a-H17 (4)		G..			G..						.A.		G..	..A	
RBP1a-H18 (1)					G..						.A.		G..	..A	
RBP1a-H19 (1)					G..		.G.				.A.			..A	.G.
RBP1a-H20 (1)		G..			G..		.G.				.A.			..A	.G.
RBP1a-H21 (1)		G..			G..		.G.		..T		.A.		G..	..A	
RBP1a-H22 (1)					G..						.A.		G..	..A	
RBP1a-H23 (5)					G..		.G.				.A.		G..	..A	
RBP1a-H24 (1)					G..						.A.	G..	G..	..A	
RBP1a-H25 (1)		G..	..T		G..		.G.						G..	..A	
RBP1a-H26 (1)					G..		.G.				.A.		G..	..A	
RBP1a-H27 (1)					G..						.A.		G..	..A	
RBP1a-H28 (1)					G..		.G.			..C			G..		
RBP1a-H29 (1)															
RBP1a-H30 (1)					G..		.G.				.A.		G..	..A	
RBP1a-H31 (1)		G..													

Tabla 4. (Continuación…) Haplotipos *Pvrbp1a-2* presentes en 70 muestras de *P. vivax* ecuatorianos.

Polimorfismos *Pvrbp1a-2*		N532D	N539Y	D558N	Q561K	D565A	T566P	Y572F	M574R	K585Q	L590F	K595N	Y597S	G599L/E	L603S
SAL-1	**AA**	N	N	D	Q	D	T	Y	M	K	L	K	Y	G	L
	Nucleótido	AAC	AAT	GAT	CAA	GAC	ACA	TAT	ATG	AAA	TTA	AAA	TAC	GGA	TTG
Variación nucleótido		**G**AC	**T**AT	**A**AT	**A**AA	G**C**C	**CC**C	T**T**T	A**G**G	**C**AA	TT**C**	AA**T**	T**C**C	**TT**A/G**A**A	T**C**G
Haplotipos (N)															
RBP1a-H1 (10)				A..										TT.	
RBP1a-H2 (1)					A..									.A.	.C.
RBP1a-H3 (8)					A..									.A.	.C.
RBP1a-H4 (2)				A..				.T.						TT.	
RBP1a-H5 (3)															
RBP1a-H6 (1)					A..									.A.	.C.
RBP1a-H7 (1)					A..									.A.	.C.
RBP1a-H8 (1)				A..										TT.	
RBP1a-H9 (1)		G..	T..	A..		.C.	C.C	.T.		C..	..C		.C.	TT.	
RBP1a-H10 (1)				A..										TT.	
RBP1a-H11 (1)				A..										TT.	
RBP1a-H12 (1)					A..									.A.	.C.
RBP1a-H13 (1)				A..										TT.	
RBP1a-H14 (1)				A..										TT.	
RBP1a-H15 (1)					A..									TT.	
RBP1a-H16 (14)					A..									TT.	
RBP1a-H17 (4)					A..									TT.	
RBP1a-H18 (1)					A..									TT.	
RBP1a-H19 (1)					A..									TT.	
RBP1a-H20 (1)					A..									TT.	
RBP1a-H21 (1)					A..									TT.	
RBP1a-H22 (1)					A..									TT.	
RBP1a-H23 (5)					A..									TT.	
RBP1a-H24 (1)					A..									TT.	
RBP1a-H25 (1)					A..				.G.					.A.	.C.
RBP1a-H26 (1)					A..									.A.	.C.
RBP1a-H27 (1)					A..									TT.	
RBP1a-H28 (1)														.A.	
RBP1a-H29 (1)												..T			
RBP1a-H30 (1)					A..									TT.	
RBP1a-H31 (1)			T..												

Tabla 4. (Continuación) Haplotipos *Pvrbp1a-2* presentes en 70 muestras de *P. vivax* ecuatorianos.

Polimorfismos *Pvrbp1a-2*		**K606N**	**E609G**	**S617R**	**T619P**	**Q625R/P**	**A630A**	**R631P**
SAL-1	**AA**	K	E	S	T	Q	A	R
	Nucleótido	AAA	GAA	AGC	ACA	CAG	GCG	CGT
Variación nucleótido		AA**C**	G**G**A	AG**A**	**C**CA	C**G**G/C**C**G	GC**C**	C**C**T
Haplotipos (N)								
RBP1a-H1 (10)								
RBP1a-H2 (1)						.G.		
RBP1a-H3 (8)								
RBP1a-H4 (2)								
RBP1a-H5 (3)								
RBP1a-H6 (1)								
RBP1a-H7 (1)						.G.		
RBP1a-H8 (1)						.G.		
RBP1a-H9 (1)			.G.		C..		..C	.C.
RBP1a-H10 (1)								
RBP1a-H11 (1)								
RBP1a-H12 (1)						.C.		
RBP1a-H13 (1)						.G.		
RBP1a-H14 (1)								
RBP1a-H15 (1)				..A				
RBP1a-H16 (14)				..A				
RBP1a-H17 (4)				..A				
RBP1a-H18 (1)				..A		.G.		
RBP1a-H19 (1)				..A				
RBP1a-H20 (1)		..C		..A		.C.		
RBP1a-H21 (1)				..A		.G.		
RBP1a-H22 (1)				..A				
RBP1a-H23 (5)				..A				
RBP1a-H24 (1)				..A		.C.		
RBP1a-H25 (1)								
RBP1a-H26 (1)								
RBP1a-H27 (1)				..A				
RBP1a-H28 (1)								
RBP1a-H29 (1)								
RBP1a-H30 (1)				..A				
RBP1a-H31 (1)						.G.		

Tabla 5. Haplotipos *Pvama1* presentes en 73 muestras de *P. vivax* ecuatorianos.

Polimorfismos *Pvama1*		**G42V**	**T44S**	**R66K**	**S70F**	**V102V**	**S106S**	**D107A**	**R112T**	**K120R**	**N130K**	**N132D**	**P137P**	**L140I**	**A141E**	**E145A**
SAL-1	**AA**	G	T	R	S	V	S	D	R	K	N	N	P	L	A	E
	Nucleótido	GGG	ACC	AGA	TCT	GTT	TCT	GAC	AGA	AAG	AAT	AAT	CCA	TTA	GCG	GAA
Variación nucleótido		G**T**G	**T**CC	A**A**A	T**T**T	GT**C**	TC**C**	G**CT**	A**CC**	A**GG**	AA**G**	**G**AT	CC**C**	**A**TA	G**A**G	G**C**A
Haplotipo (N)																
AMA1-H1 (13)						..C	..C	.CT	.CC	.G.	..G	G..	..C			
AMA1-H2 (3)		.T.											..C	A..		.C.
AMA1-H3 (7)				.A.		..C	..C	.CT	.CC	.G.			..C		.A.	.C.
AMA1-H4 (1)				.A.		..C	..C	.CT	.CC	.G.			..C		.A.	.C.
AMA1-H5 (6)				.A.		..C	..C	.CT	.CC	.G.	..G	G..	..C			
AMA1-H6 (2)				.A.									..C			
AMA1-H7 (1)						..C	..C	.CT	.CC	.G.	..G	G..	..C			
AMA1-H8 (25)				.A.		..C	..C	.CT	.CC	.G.			..C		.A.	.C.
AMA1-H9 (3)			T..			..C	..C	.CT	.CC	.G.			..C		.A.	.C.
AMA1-H10 (1)			T..			..C	..C	.CT	.CC	.G.			..C		.A.	.C.
AMA1-H11 (1)						..C	..C	.CT	.CC	.G.	..G	G..	..C		.A.	.C.
AMA1-H12 (5)				.A.		..C	..C	.CT	.CC	.G.	..G	G..	..C		.A.	.C.
AMA1-H13 (1)			T..			..C	..C	.CT	.CC	.G.	..G		..C		.A.	.C.
AMA1-H14 (1)				.A.		..C	..C	.CT	.CC	.G.			..C		.A.	.C.
AMA1-H15 (2)				.A.	.T.	..C	..C	.CT	.CC	.G.			..C		.A.	.C.
AMA1-H16 (1)				.A.		..C	..C	.CT	.CC	.G.			..C		.A.	.C.

Tabla 5. (Continuación) Haplotipos *Pvama1* presentes en 73 muestras de *P. vivax* ecuatorianos.

Polimorfismos *Pvama1*		**L161L**	**E189K**	**K190Q**	**H193Y**	**P210S**	**R249H**	**E277K**	**E281Q**	**K352N**	**K368I**	**Q380K**	**L384P**	**E385D**	**K392K/Q**	**I395F**	**N445D**
SAL-1	**AA**	L	E	K	H	P	R	E	E	K	K	Q	L	E	K	I	N
	Nucleótido	TTG	GAA	AAA	CAC	CCA	CGT	GAG	GAA	AAG	AAA	CAA	CTG	GAG	AAA	ATT	AAC
Variación nucleótido		**C**TG	**A**AA	**C**AA	**T**AC	**T**CA	C**A**T	**A**AG	**C**AA	AA**T**	A**T**A	**A**AA	C**C**G	GA**T**	AA**G**/**C**AA	**T**TT	**G**AC
Haplotipo (N)																	
AMA1-H1 (13)								A..									
AMA1-H2 (3)								A..			.T.		.C.				
AMA1-H3 (7)			A..	C..				A..		..T							
AMA1-H4 (1)			A..	C..				A..		..T					..G		
AMA1-H5 (6)								A..									
AMA1-H6 (2)							.A.	A..									
AMA1-H7 (1)		C..						A..									
AMA1-H8 (25)			A..	C..				A..			.T.		.C.				
AMA1-H9 (3)									C..			A..	.C.				G..
AMA1-H10 (1)									C..			A..	.C.		C..		G..
AMA1-H11 (1)					T..	T..		A..				A..	.C.				G..
AMA1-H12 (5)					T..	T..		A..				A..	.C.				G..
AMA1-H13 (1)								A..	C..			A..	.C.				G..
AMA1-H14 (1)			A..	C..				A..			.T.		.C.	..T		T..	
AMA1-H15 (2)			A..	C..				A..			.T.		.C.				
AMA1-H16 (1)			A..	C..				A..			.T.		.C.		..G		

Tabla 6. Diversidad y diferenciación genética de *PvdbpII* entre localidades.

Localidad	S	Si	Pa	K	H	Hd (SD)	π (SD)	FST		
								Amazonía Oeste	Costa	Amazonía Este
Amazonía Oeste (N=6)	13	10	3	5,067	5	0,933 (0,122)	0,00559 (0,00200)	-		
Costa (N=12)	24	17	7	4,955	8	0,848 (0,104)	0,00547 (0,00166)	0.44414*	-	
Amazonía Este (N=31)	25	12	13	5,329	17	0,914 (0,035)	0,00588 (0,00069)	0,14257*	0,4106*	-

S: sitios polimórficos, Si: sitios únicos, Pa: sitios parsimónicos, K: número promedio de diferencias entre nucleótidos, H: número de haplotipos, Hd: diversidad de haplotipos, π: diversidad nucleotídica, SD: desviación estándar. * Valores significativos (p<0,05).

Tabla 7. Diversidad y diferenciación genética de *Pvrbp1a-2* entre localidades.

Localidad	S	Si	Pa	K	H	Hd (SD)	π (SD)	FST		
								Amazonía Oeste	Costa	Amazonía Este
Amazonía Oeste (N=7)	14	7	7	5,333	5	0,857 (0,137)	0,00626 (0,00155)	-		
Costa (N=19)	33	28	5	4,023	9	0,731 (0,109)	0,00472 (0,00200)	0,55622*	-	
Amazonía Este (N=43)	28	14	14	4,292	20	0,875 (0,041)	0,00504 (0,00078)	0,30473*	0,5066*	-

S: sitios polimórficos, Si: sitios únicos, Pa: sitios parsimónicos, K: número promedio de diferencias entre nucleótidos, H: número de haplotipos, Hd: diversidad de haplotipos, π: diversidad nucleotídica, SD: desviación estándar. * Valores significativos (p<0,05).

Tabla 8. Diversidad y diferenciación genética de *Pvama1* entre localidades.

Localidad	S	Si	Pa	K	H	Hd (SD)	π (SD)	FST		
								Amazonía Oeste	Costa	Amazonía Este
Amazonía Oeste (N=8)	25	7	18	11,036	5	0,893 (0,086)	0,00693 (0,00095)	-		
Costa (N=19)	9	1	8	3,380	3	0,485 (0,104)	0,00212 (0,00050)	0,35536*	-	
Amazonía Este (N=45)	30	13	17	5,378	11	0,677 (0,073)	0,00338 (0,00048)	0,27113*	0,39884*	-

S: sitios polimórficos, Si: sitios únicos, Pa: sitios parsimónicos, K: número promedio de diferencias entre nucleótidos, H: número de haplotipos, Hd: diversidad de haplotipos, π: diversidad nucleotídica, SD: desviación estándar. * Valores significativos ($p<0,05$).

Tabla 9. Estimación de la diversidad y diferenciación genética entre diversas poblaciones geográficas de *P. vivax* utilizando secuencias disponibles del gen *PvdbpII*.

Población (N)	S	π (SD)	H	Hd (SD)	FST									
					ECU	BRA	COL	IND	IRA	CS	MEX	PNG	SLK	TAI
ECU (50)	31	0,00903 (0,00067)	25	0,924 (0,022)	-									
BRA (122)	20	0,00817 (0,00033)	34	0,934 (0,012)	0,05981*	-								
COL (17)	14	0,00893 (0,00071)	16	0,993 (0,023)	0,19427*	0,15969*	-							
IND (100)	36	0,00878 (0,00050)	35	0,921 (0,017)	0,05616*	0,01283*	0,17868*	-						
IRA (19)	22	0,01004 (0,00113)	17	0,988 (0,021)	0,00936	0,00801	0,15142*	0,01529	-					
CS (15)	16	0,00553 (0,00063)	13	0,971 (0,039)	0,11660*	0,10658*	0,30625*	0,09359*	0,10616*	-				
MEX (35)	10	0,00400 (0,00077)	7	0,553 (0,092)	0,09361*	0,19368*	0,35432*	0,21595*	0,13550*	0,33474*	-			
PNG (200)	73	0,00971 (0,00033)	72	0,919 (0,012)	0,13954*	0,12336*	0,21038*	0,12734*	0,09830*	0,17530*	0,22687*	-		
SLK (100)	27	0,00973 (0,00053)	39	0,922 (0,014)	0,06443*	0,03066*	0,18452*	0,01917*	0,03126	0,08538*	0,22646*	0,13703*	-	
TAI (30)	29	0,01093 (0,00054)	24	0,982 (0,014)	0,09646*	0,08425*	0,21381*	0,07510*	0,02140	0,13746*	0,20712*	0,13746*	0,10006*	-

S: sitios polimórficos, π: diversidad nucleotídica, H: número de haplotipos, Hd: diversidad de haplotipos, SD: desviación estándar. * Valores significativos ($p<0,05$).

Tabla 10. Estimación de la diversidad y diferenciación genética entre diversas poblaciones geográficas de *P. vivax* utilizando secuencias disponibles del gen *Pvama1*.

Población (N)	S	π (SD)	H	Hd (SD)	FST					
					ECU	IND	PNG	SLK	TAI	VEN
ECU (73)	33	0,00465 (0,00035)	16	0,836 (0,031)	-					
IND (8)	27	0,00710 (0,00098)	6	0,929 (0,084)	0,35220*	-				
PNG (102)	44	0,00804 (0,00021)	87	0,996 (0,002)	0,37766*	0,11229*	-			
SLK (23)	34	0,00674 (0,00066)	15	0,949 (0,028)	0,48394*	0,24452*	0,25450*	-		
TAI (231)	57	0,00834 (0,00018)	96	0,934 (0,012)	0,29150*	0,10716*	0,19695*	0,19117*	-	
VEN (73)	29	0,00664 (0,00016)	18	0,909 (0,016)	0,12935*	0,20635*	0,25816*	0,25052*	0,15506*	-

S: sitios polimórficos, π: diversidad nucleotídica, H: número de haplotipos, Hd: diversidad de haplotipos, SD: desviación estándar. * Valores significativos ($p<0,05$).

Tabla 11. Pruebas de neutralidad para los genes involucrados en la invasión de reticulocitos.

Gen	Fu & Li's test		Tajima's D test	McDonald-Kreitman test		
	D* (Valor P)	F* (Valor P)	Tajima's D (Valor P)	Dentro de spp. (S/NS)	Entre spp. (S/NS)	Valor P
PvdbpII (N=50)	-2,99684 (P<0,05) *	-2,77579 (P<0,05) *	-1,15380 (P>0,10) NS	9/34	56/105	0,098432
Pvrbp1a-2 (N=70)	-3,80015 (P<0,02) **	-3,48451 (P<0,02) **	-1,50687 (P>0,10) NS	-	-	-
Pvama1 (N=73)	0,81125 (P>0,10) NS	0,64509 (P>0,10) NS	0,09268 (P>0,10) NS	6/27	130/85	0,000007***

* Valores significativos, ** valores altamente significativos

Tabla 12. Análisis de polimorfismos y pruebas de neutralidad en epítopos de células B inhibitorias (previamente determinadas), pertenecientes a la región II del gen *P. vivax* Duffy Binding Protein (*PvdbpII*), en muestras ecuatorianas.

Epítopo	Secuencia	S	Si	Pa	K	H	Hd (SD)	π (SD)	Pruebas de neutralidad		
									F&L D* (Valor P)	F&L F* (Valor P)	Tajima's D (Valor P)
H1	FHRDITFRKLYLKRKL	2	1	1	0,39	3	0,358 (0,071)	0,00813 (0,00177)	-0,89288 (P>0,10) NS	-0,80772 (P>0,10) NS	-0,22497 (P>0,10) NS
H2	EGDLLLKLNNYRYN	1	0	1	0,115	2	0,115 (0,059)	0,00274 (0,00141)	0,54316 (P>0,10) NS	0,23064 (P>0,10) NS	-0,65084 (P>0,10) NS
H3	DEKAQQRRKQWWNESK	5	1	4	1,665	5	0,732 (0,029)	0,03469 (0,00270)	0,13389 (P>0,10) NS	0,54245 (P>0,10) NS	1,19195 (P>0,10) NS
M1	FCKDIRWSLGDF	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
M2	LKGNFIWICKLNVAVN	3	0	3	1,154	4	0,607 (0,039)	0,02405 (0,00171)	0,89169 (P>0,10) NS	1,25023 (P>0,10) NS	1,49477 (P>,010) NS
M3	PQIYRWIREWGRDYVS	2	1	1	0,543	3	0,525 (0,027)	0,01131 (0,00088)	-0,89288 (P>0,10) NS	-0,59866 (P>0,10) NS	0,38498 (P>0,10) NS
L1	CIPDRRYQLCMK	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
L2	AQIWTAMMYSVK	3	2	1	0,296	4	0,285 (0,078)	0,00821 (0,00236)	-1,71777 (P>0,10) NS	-1,80284 (P>0,10) NS	-1,15457 (P>0,10) NS
L3	MEGIGYSKVVENNL	1	0	1	0,444	2	0,444 (0,049)	0,01057 (0,00117)	0,54316 (P>0,10) NS	0,88984 (P>0,10) NS	1,32891 (P>0,10) NS
L4	DWDCNTKKDVCIPD	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-

S: sitios polimórficos, Si: sitios únicos, Pa: sitios parsimónicos, K: número promedio de diferencias entre nucleótidos, H: número de haplotipos, Hd: diversidad de haplotipos, π: diversidad nucleotídica, SD: desviación estándar.

Tabla 13. Estimación y comparación de la diversidad genética entre dominios de *Pvama1* en 73 muestras de *P. vivax* ecuatorianos.

Dominios	S	Si	Pa	K	H	Hd (SD)	π (SD)
Gen completo (N=73)	33	4	29	6,986	16	0,836 (0,031)	0,00439 (0,00033)
DI	19	1	18	4,645	11	0,730 (0,047)	0,00831 (0,00079)
DII	8	1	7	1,763	8	0,732 (0,035)	0,00428 (0,00034)
DIII	4	2	2	0,368	5	0,331 (0,065)	0,00137 (0,00030)

S: sitios polimórficos, Si: sitios únicos, Pa: sitios parsimónicos, K: número promedio de diferencias entre nucleótidos, H: número de haplotipos, Hd: diversidad de haplotipos, π: diversidad nucleotídica, SD: desviación estándar.

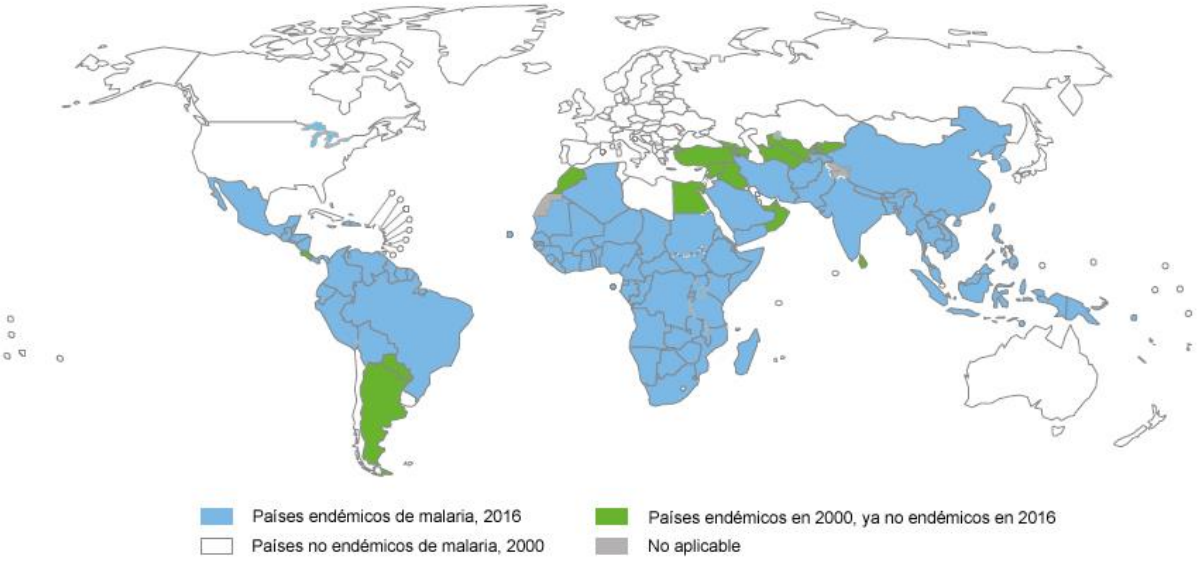
Tabla 14. Pruebas de neutralidad en cada dominio de *Pvama1* en 73 muestras de *P. vivax* ecuatorianos.

Dominios	Fu & Li's test		Tajima's D test	McDonald-Kreitman test		
	D* (Valor P)	F* (Valor P)	Tajima's D (Valor P)	Dentro de spp. (S/NS)	Entre spp. (S/NS)	Valor P
Gen completo (N=73)	0,81125 (P>0,10) NS	0,64509 (P>0,10) NS	0,09268 (P>0,10) NS	6/27	130/85	0,000007***
DI	1,26773 (P>0,10) NS	1,20698 (P>0,10) NS	0,56456 (P>0,10) NS	5/14	46/30	0,009933**
DII	0,51261 (P>0,10) NS	0,47490 (P>0,10) NS	0,18210 (P>0,10) NS	0/8	30/16	0,000707***
DIII	-1,35328 (P>0,10) NS	-1,51472 (P>0,10) NS	-1,15994 (P>0,10) NS	1/3	20/9	0,09198

* Valores significativos, ** valores altamente significativos

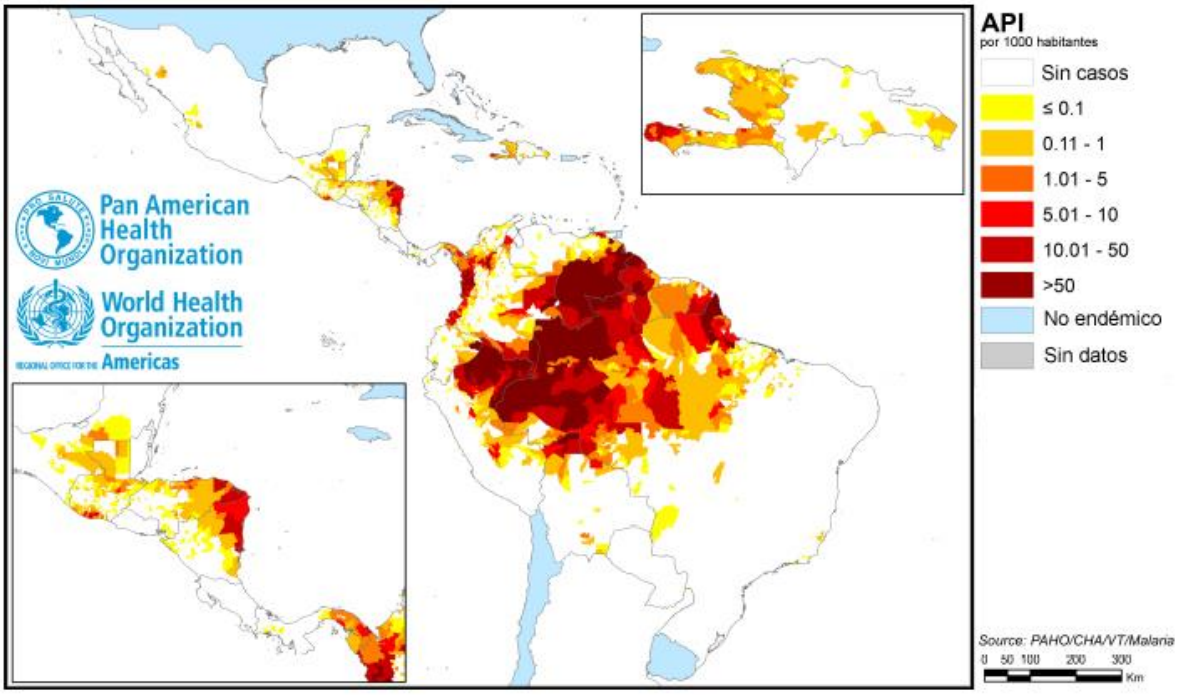
12. ANEXOS

Anexo 1. Mapa de la distribución mundial de malaria en el año 2000 y 2016.

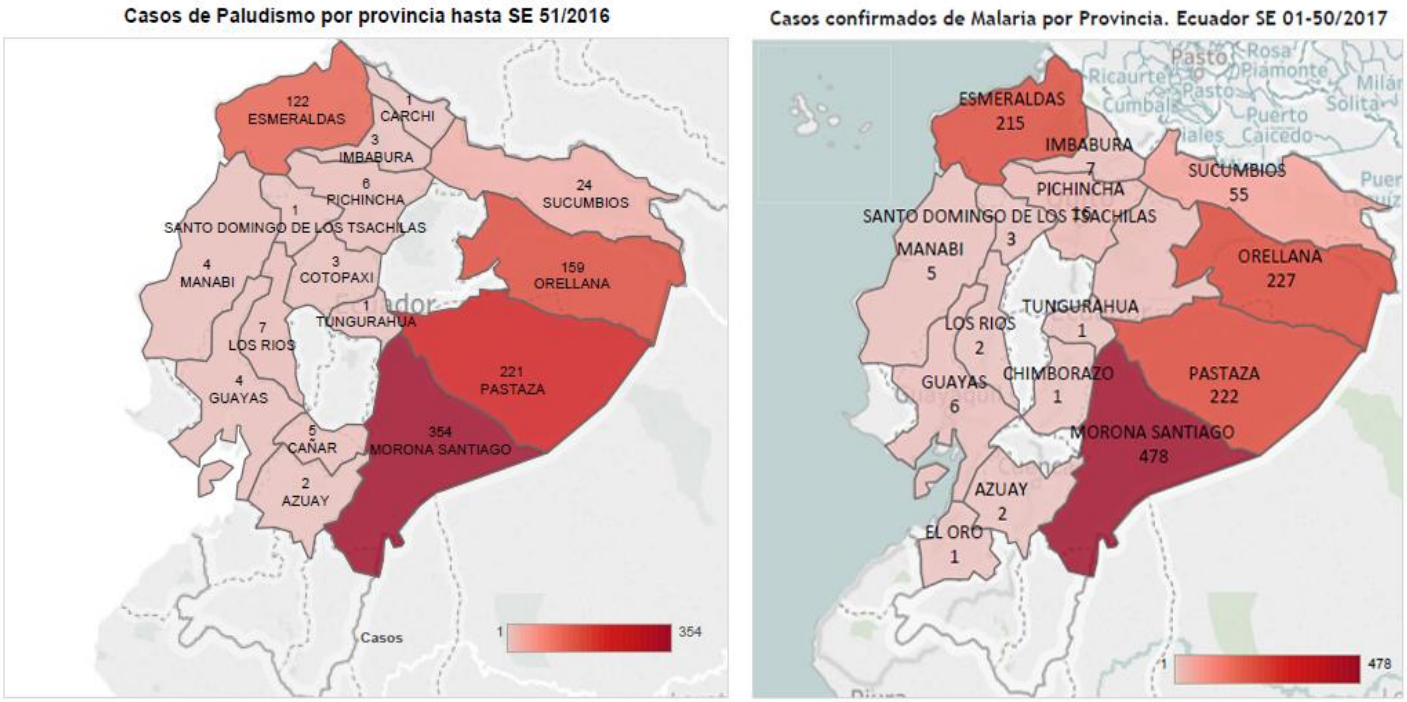


Fuente: Modificado de (OMS, 2017).

Anexo 2. Mapa de la distribución de malaria en América en 2015 según el índice parasitario anual (API).

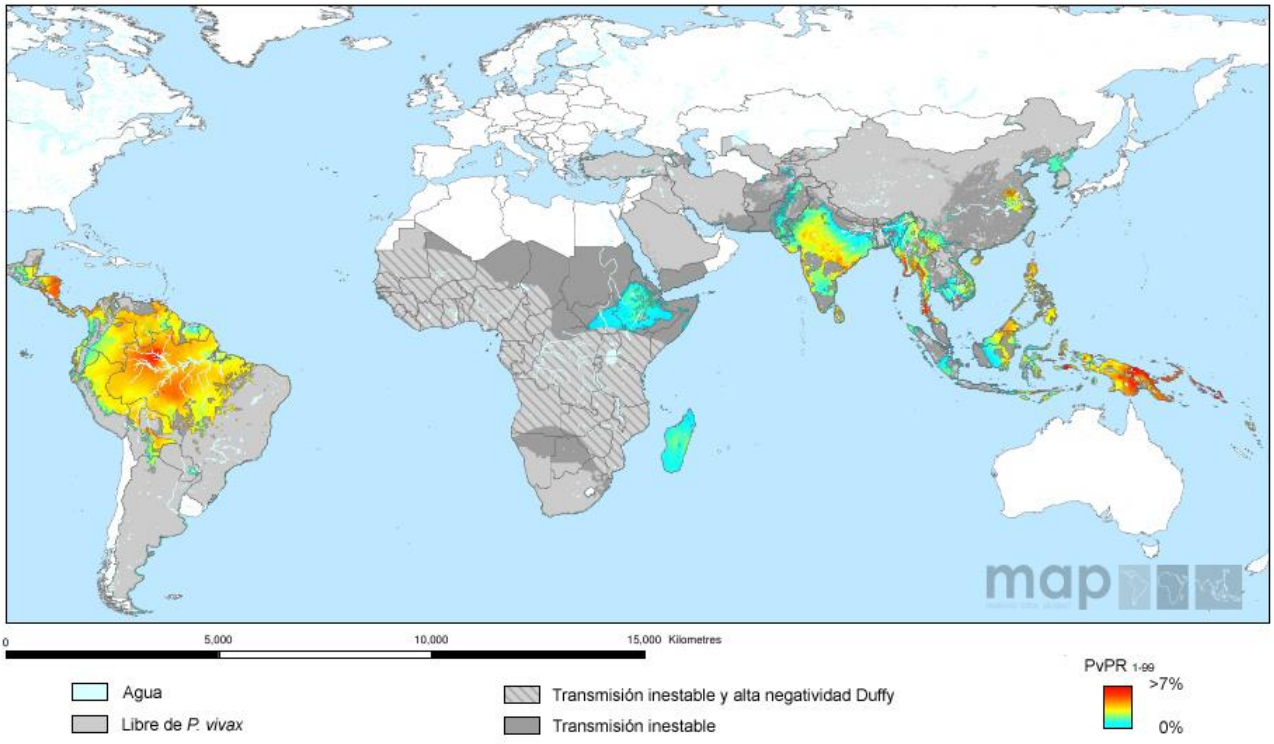


Anexo 3. Casos reportados de malaria en Ecuador entre el 2016 y 2017.

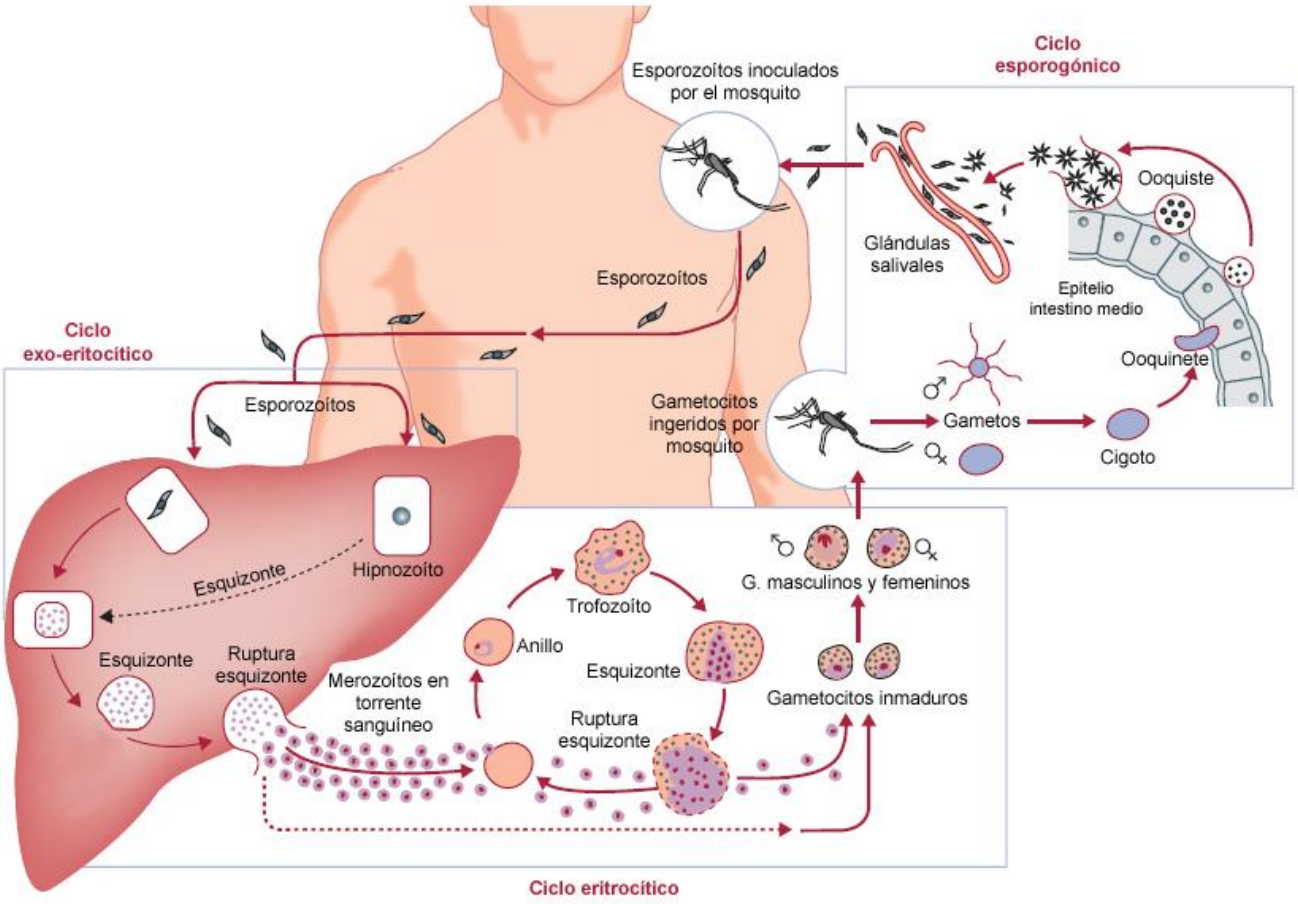


Fuente: Subsistema SIVE-ALERTA , Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica 2017

Anexo 4. Mapa de la distribución mundial de *Plasmodium vivax* en 2010.

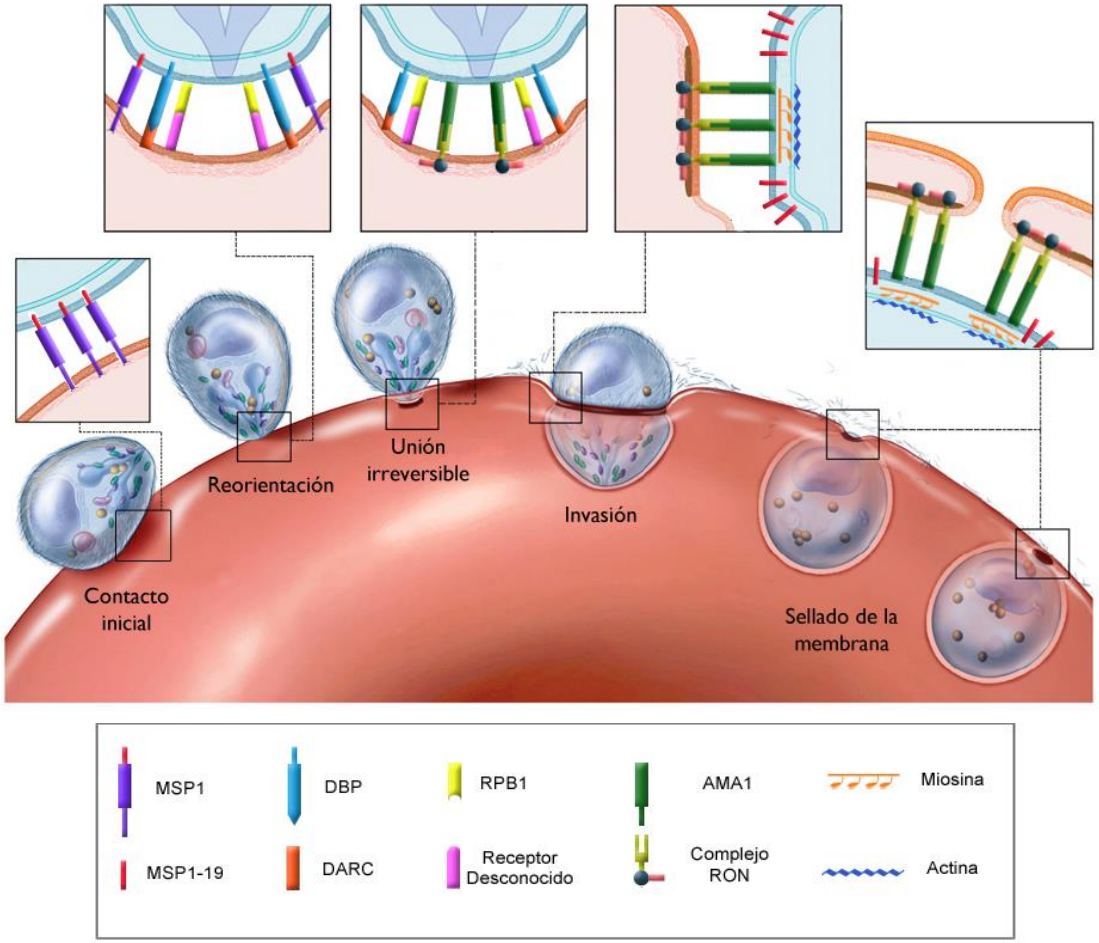


Anexo 5. Ciclo de vida de *Plasmodium vivax*.



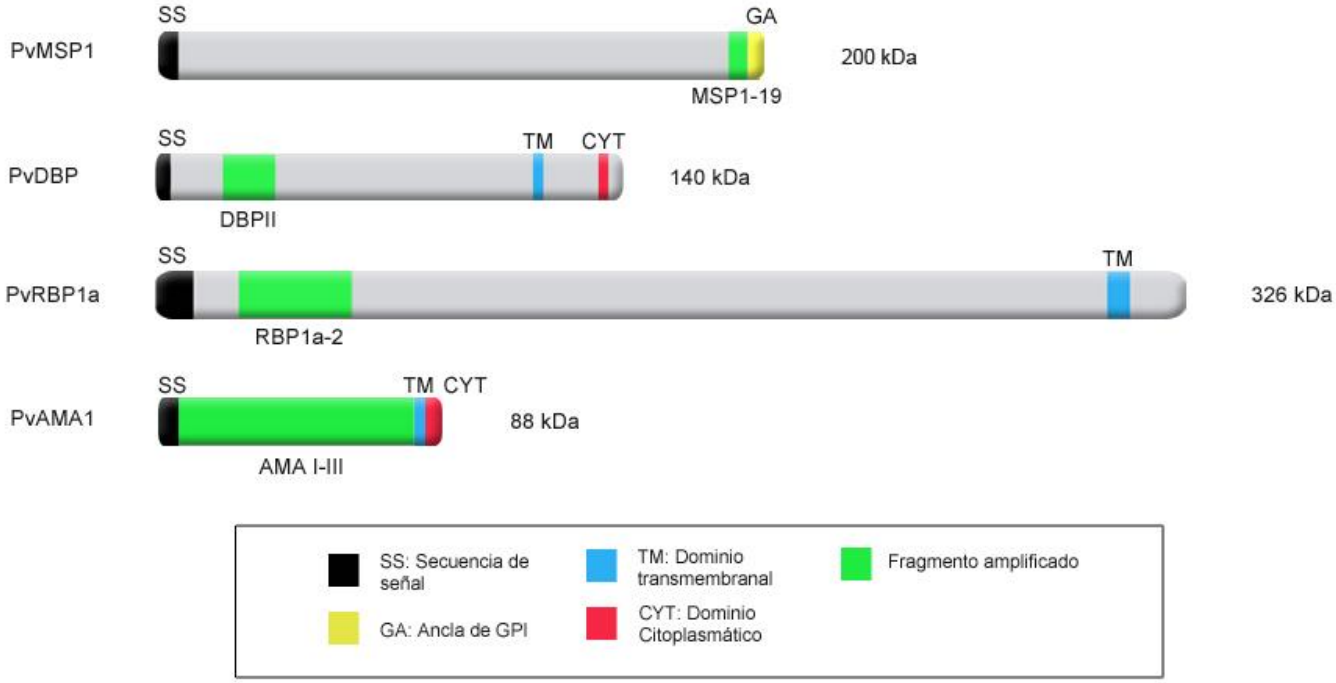
Fuente: Modificado de (Mueller et al., 2009).

Anexo 6. Proceso de invasión de merozoítos en *P. vivax*.

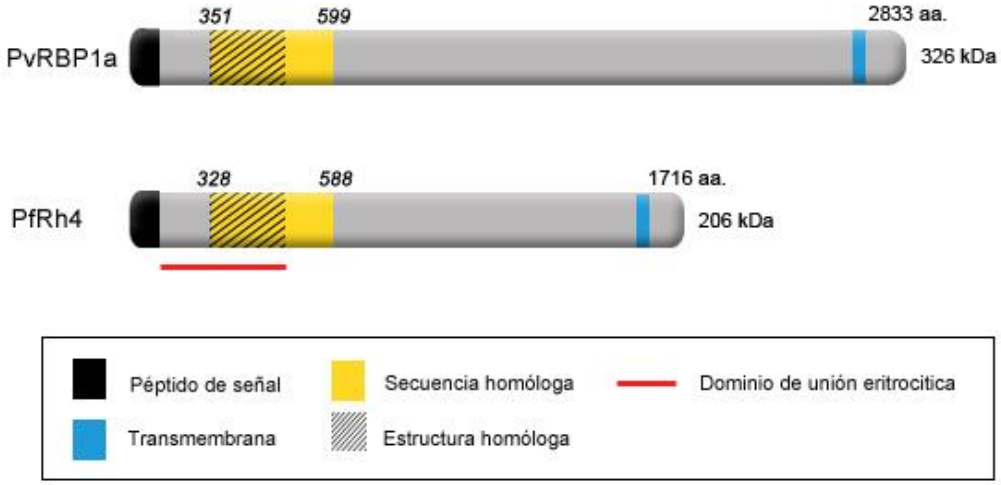


Fuente: Modificado de (Srinivasan et al., 2011).

Anexo 7. Estructura esquemática de las proteínas invasivas y los fragmentos amplificados.



Anexo 8. Representación del dominio homólogo de la proteína PfRh4, expresada por *P. falciparum*, involucrada en la unión eritrocítica.



Fuente: Modificado de (Han et al., 2016).

Anexo 9. Consentimiento informado

Ministerio de Salud Pública
Servicio Nacional de Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores Artrópodos "SNEM"

Formulario de Consentimiento Informado.
Parte 1. CLÍNICA. Información para el paciente sano y el paciente con enfermedad activa

Responsables: Dr. Fabián Sáenz y Dr. Enrique Castro Saavedra

Organización: Ministerio de Salud Pública del Ecuador – SNEM y Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Investigación sobre la malaria en Ecuador

Introducción: El Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIEI) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) se encuentra realizando trabajos de investigación sobre la malaria en el Ecuador y deseamos invitarle a participar en esta investigación. Antes de decidir participar o no, usted puede consultar con alguien más sobre su participación. Vamos a leer este documento que tiene los detalles sobre la investigación, sin embargo, si hay alguna palabra que no entienda, por favor, infórmenos para poder explicarle. Usted puede realizar preguntas en cualquier momento.

Propósito del proyecto: La Malaria es una enfermedad que afecta a mucha gente en Ecuador. Este proyecto de investigación quiere saber si hay esta enfermedad en su comunidad y porqué. Pedimos su ayuda voluntaria. Su participación ayudará a obtener información valiosa que ayudará a diseñar maneras de controlar y prevenir esta enfermedad.

Tipo de Intervención: Esta investigación incluirá responder una encuesta con información general sobre conocimientos de la enfermedad y la toma de sangre del dedo o de la vena.

Selección de participantes: Esta es una investigación que se realizará en toda la comunidad, por lo tanto, no se necesita requisitos especiales para su participación.

Participación voluntaria: Usted puede elegir libremente participar o no participar en absoluto en este proyecto de investigación. Si usted no desea participar o se retira del estudio no habrá ninguna consecuencia y no perderá ninguno de los beneficios de atención de salud que existen normalmente. Para que usted pueda participar en este proyecto, es necesario que usted entienda lo que se vamos a necesitar. Si acepta colaborar voluntariamente con nosotros, debe firmar (o poner su huella digital) en la línea disponible abajo en este formulario.

Usted puede dejar de participar en este proyecto en cualquier momento sin necesidad de dar ninguna explicación. De igual manera, los investigadores pueden terminar su participación en el mismo. Si éste es el caso, usted será notificado. No hay costo por participar en esta investigación. Si usted tiene dudas sobre la investigación o sobre sus derechos en este proyecto de investigación, por favor pregunte al entrevistador o contacte a las personas nombradas abajo.

Procedimientos: Un encuestador le pedirá que responda ciertas preguntas sobre su conocimiento de malaria. Además, personal entrenado tomará muestras de sangre. Las muestras de sangre se tomarán una o dos veces mediante un pinchazo en el dedo, con una lanceta, para obtener 10 gotas de sangre. Es posible

que se solicite una muestra más grande de sangre para llevar a cabo estudios más detallados, esta vez la sangre será tomada del brazo usando una jeringa para obtener entre 3 y 10 ml de sangre (entre 1 y 3 cucharaditas). Estas muestras serán examinadas por los médicos, de encontrarse que usted requiere tratamiento médico, será referido a las unidades del Ministerio de Salud.

Investigación: La investigación utilizará parte de la información clínica y parte de las muestras de sangre sin que estos tengan referencia a su nombre. A sus muestras e información privada se le asignará un código. Esta información será utilizada para estudiar las enfermedades en su comunidad y respuesta a medicamentos y cómo éstas se relacionan con los factores de riesgo a los cuales usted puede estar expuesto. Usted no será identificado por nombre en ningún informe publicado ni en presentaciones de los resultados. Las muestras, sin conexión con su nombre serán almacenadas en refrigeración o congelación y podrán ser utilizadas en el futuro para otros estudios como el cultivo de parásitos obtenidos de su sangre para determinar si hay resistencia a medicamentos, así como estudios de la biología de parásito, previa aprobación por parte de un comité de ética.

Confidencialidad: Toda la información que usted proporcione será mantenida confidencialmente y utilizada solamente para propósitos de la investigación sin conexión a su nombre. Los resultados generales, serán compartidos con el Ministerio de Salud Pública del Ecuador y su comunidad.

Riesgos: Los riesgos potenciales asociados a su participación son las molestias al sacar la sangre. La toma de muestras de sangre será realizada por profesionales debidamente entrenados, utilizando agujas y lancetas nuevas, siguiendo normas internacionales, lo que reducirá la posibilidad de molestias por la toma de sangre.

Beneficios: Los beneficios potenciales de su participación incluyen un incremento en el conocimiento sobre la prevención de enfermedades tropicales y la futura implementación de estrategias de control e intervención, que tienen el potencial de mejorar la salud de su comunidad.

Compensaciones: No existe compensación financiera por su participación en el estudio.

Declaración general de consentimiento: "Al firmar (o poner mi huella digital) abajo, declaro que los investigadores a cargo de este proyecto me han explicado los propósitos y los beneficios y riesgos de la investigación, y que los he entendido plenamente. Entiendo claramente que no hay compensación monetaria por mi participación de parte de la PUCE, ni de las otras instituciones implicadas, y/o de sus empleados, y que en caso de alguna lesión que pudiese sufrir por mi participación en esta investigación, se buscarán las prestaciones médicas necesarias sin costo para mí a través de las unidades del Ministerio de Salud". Al firmar (o poner mi huella digital) abajo declaro que entiendo el alcance y los objetivos del Proyecto, y estoy dispuesto a participar voluntariamente".

Nombre del participante:

Firma (o huella digital) del participante o su representante legal._____ Fecha: _____ de ___ del 201_

He leído con exactitud o he sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento informado para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmo que el individuo ha dado consentimiento libremente.

Nombre del testigo:

Firma del testigo (en caso de analfabetismo) _____ Fecha: _____ de _____ del 201_

Declaración de asentimiento (para menores entre 12 y 18 años de edad)
Yo, _____, tengo ___ años de edad, entiendo los objetivos de esta investigación y que es lo que se espera de mí. Por lo tanto, acepto participar voluntariamente.

(Firma, del menor) _____ Fecha: _____ de ___ del 201_

Nombre del investigador/asistente:

Firma del investigador/asistente: _____ Fecha: _____ de _____ del 201_

Ha sido proporcionado, al participante, una copia de este documento _____ (iniciales del investigador/asistente)

Personas a contactar: Esta propuesta ha sido revisada y aprobada por el Comité de Ética de la PUCE, que es un comité cuya tarea es asegurarse de que se protege de daños a los participantes en la investigación. Si usted tiene preguntas sobre esta investigación por favor comuníquese con el Dr. Fabián Sáenz o con la Dra. Sofía Ocaña, CIEI Universidad Católica del Ecuador. Ave. 12 de octubre 1076 y Roca. Tel. (02) 299 1700 ext. 2272 ó 2271. Fax. (02) 299 1689 Email: fsaenz213@puce.edu.ec ó sbocana@puce.edu.ec.

Si tiene preguntas sobre sus derechos como participante en esta investigación comuníquese con el Dr. Arturo Donoso, Comité de Ética, Universidad Católica del Ecuador Ave. 12 de octubre 1076 y Roca. Tel. (02) 299 1533 ext. Fax. 02 299 1656 Email: ajdonoso@puce.edu.ec.

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Andrés Esteban Núñez Vaca**,** con CC.# 1721205639, autor del trabajo de graduación intitulado "Diversidad de genes de invasión de reticulocitos en *Plasmodium vivax* ecuatorianos" previa la obtención del grado académico de Licenciado en Ciencias Biológicas, en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 16 de marzo de 2018

Andrés Esteban Núñez Vaca
1721205639