



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**DIVERSIDAD GENÉTICA, ESTRUCTURA POBLACIONAL Y DEMOGRAFÍA
HISTÓRICA DE *Plasmodium vivax* DURANTE 19 AÑOS DE TRANSMISIÓN EN
EL SURESTE DE MÉXICO**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
ALEJANDRO FLORES ALANIS

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. LILIA GONZÁLEZ CERÓN
CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA, INSP
COMITÉ TUTOR:

DRA. CECILIA XIMENEZ GARCÍA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. LEÓN PATRICIO MARTÍNEZ CASTILLA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CD. MX. FEBRERO DE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Para mi madre amada
Alejandra Alanis Garduño †**

AGRADECIMIENTOS.

A mi directora de tesis, la Dra. Lilia González Cerón, por su atención, apoyo y consejos que me ayudaron durante la realización de este trabajo.

Al Dr. René Cerritos Flores por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y su asesoría en el desarrollo de esta tesis.

A la Dr. Cecilia Ximenez García y al Dr. León Patricio Martínez Castilla por su atención, tiempo y valiosas aportaciones hacia mi trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado de Doctorado en Ciencias Biomédicas por abrirme las puertas y dejar que mis sueños sigan haciéndose realidad.

A CONACyT por la beca de doctorado 47132 y los fondos para el proyecto CB12134.

AGRADECIMIENTOS POR APOYO TÉCNICO

A los M. en C. Frida Santillán y Marco Antonio Sandoval por su ayuda en el laboratorio de parasitología molecular del Centro Regional de Investigación en Salud Pública de Tapachula, Chiapas, México.

CONTENIDO.

	Pag.
1. Resumen.	1
2. Introducción general.	2
2.1. Situación actual del paludismo.	2
2.2. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> spp.	2
2.3. Paludismo causado por <i>Plasmodium vivax</i> (paludismo <i>vivax</i>).	4
2.4. El genoma de <i>Plasmodium vivax</i> .	7
2.5. Procesos evolutivos que determinan la diversidad genética en las poblaciones.	8
2.5.1. Mutación	8
2.5.2. Flujo génico y recombinación.	9
2.5.3. Selección natural.	10
2.5.4. Deriva génica.	11
2.6. Marcadores moleculares para el estudio de la genética de poblaciones en <i>Plasmodium vivax</i> .	11
2.6.1. Microsatélites.	12
2.6.2. Polimorfismos de un simple nucleótido (SNPs).	13
2.6.3. ADN mitocondrial.	14
2.6.4. Genes que codifican proteínas antigénicas.	16
2.6.4.1. Proteína de superficie del merozoíto 1 de <i>Plasmodium vivax</i> (<i>pvmsp1</i>).	18
2.6.4.2. Antígeno de la membrana apical 1 de <i>Plasmodium vivax</i> (<i>pvama1</i>).	20
2.7. Paludismo en México.	21
2.7.1. Paludismo <i>vivax</i> en el estado de Chiapas.	21
2.7.2. Genética poblacional de <i>Plasmodium vivax</i> en el sureste de Chiapas, México.	22
2.8. Justificación.	24
3. Objetivos.	25
3.1. Objetivo general.	25
3.2. Objetivos particulares.	25

4.	Capítulo 1. La selección natural balanceadora ha mantenido la diversidad genética de <i>Plasmodium vivax</i> en una región de baja transmisión del sureste de México, 1993-2011.	26
	Resumen.	26
	Introducción.	27
	Métodos.	28
	Resultados.	32
	Discusión.	50
	Conclusiones.	53
	Referencias.	54
	Temporal genetic changes in <i>Plasmodium vivax</i> apical membrane antigen 1 over 19 years of transmission in southern Mexico.	60
5.	Capítulo 2. La población de <i>Plasmodium vivax</i> del sureste de México presenta diferenciación genética alta y contracción demográfica.	73
	Resumen.	73
	Introducción.	73
	Métodos.	74
	Resultados.	78
	Discusión.	87
	Conclusiones.	90
	Referencias.	90
6.	Comentarios finales y perspectivas.	95
7.	Anexos	97
8.	Referencias.	102

1. Resumen.

Plasmodium vivax es el parásito causante del paludismo más prevalente fuera del continente africano. En México, la implementación y acción de las campañas de control han reducido considerablemente el número de casos, de tal manera que en 2007 México pasó a fase de pre-eliminación. Actualmente *P. vivax* es el responsable del 100 % de los casos de paludismo autóctonos a nivel nacional, el 70 % de estos se concentran en el foco de transmisión en la frontera entre el estado de Chiapas, México y Guatemala. Uno de los factores fundamentales que dificulta la eliminación de *P. vivax* es su diversidad genética alta. La diversidad genética es el resultado de diversos procesos biológicos-evolutivos como mutación, flujo génico y recombinación, deriva génica y selección natural. El entender cómo estos procesos afectan en el tiempo a las poblaciones del parásito es de gran ayuda para la identificación del origen de las infecciones, diseño de vacunas y detección de resistencia a fármacos. En este trabajo analizamos la genética poblacional y demografía histórica de *P. vivax* en la jurisdicción sanitaria VII del estado de Chiapas (Sureste de México) durante 1993-2011. Utilizamos dos marcadores nucleares candidatos para vacunas: el fragmento de 42kDa de la proteína de superficie del merozoíto 1 (*pvmSP1₄₂*) y el dominio I y II del antígeno de la membrana apical 1 (*pvama1_{I-II}*) para estudiar la dinámica evolutiva de *P. vivax*. Para estudiar la demografía histórica se analizó la región 3' del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (*pvcox1₅₁₀*). Los resultados con los marcadores *pvmSP1₄₂* y *pvama1_{I-II}* demostraron que en la población de *P. vivax* del sureste de México la diversidad genética durante 1993-2011 fue baja con respecto a otras zonas geográficas, y presentó haplotipos muy frecuentes que han persistido por selección natural balanceadora. Con el marcador *pvcox1₅₁₀* encontramos que la población de *P. vivax* del sureste de México es divergente y altamente diferenciada respecto a otras poblaciones de parásitos de otras regiones en América y fuera del continente. Además, presentó una contracción demográfica de 1993-2011, posiblemente como resultado de la reducción de casos de paludismo. Esos resultados tienen una gran significancia en el entendimiento de la dinámica de transmisión de *P. vivax* en el sureste de México, además es información valiosa para el mejoramiento de los sistemas de vigilancia epidemiológica molecular y las campañas de eliminación del paludismo a nivel regional.

Palabras clave: paludismo, *Plasmodium vivax*, sureste de México, *pvmSP1₄₂*, *pvama1_{I-II}*, *pvcox1₅₁₀*, diversidad genética, selección natural, demografía histórica.

2. Introducción general.

2.1. Situación actual del paludismo.

El paludismo o malaria es una enfermedad de regiones tropicales y subtropicales que ha afectado a la humanidad a lo largo de la historia (Cox, 2002). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que existen aproximadamente 3 mil millones de personas en zonas de riesgo de transmisión de paludismo en más de 91 países; así mismo, se estiman 216 millones de casos y 445,000 muertes por año (OMS, 2017). El paludismo es causado por protozoarios del género *Plasmodium* y se han identificado alrededor de 150 especies de este género, pero solo son de importancia médica las especies: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*. (Sermwittayawong *et al.*, 2012). *P. falciparum* es considerado el más importante en términos de muertes, principalmente en África, en donde el 90 % de las muertes son causadas por este parásito (OMS, 2017). *P. vivax* es el más mórbido fuera de África, pero ha sido considerado como causa de una enfermedad menor o “paludismo benigno” ya que raramente es mortal (Menegon *et al.*, 2014). *P. malariae* y *P. ovale* son mucho menos comunes como causantes de la enfermedad, mientras que *P. knowlesi* solo se ha reportado como causante de paludismo por zoonosis (Antinori *et al.*, 2013).

2.2. Ciclo de vida de *Plasmodium* spp.

Los parásitos del género *Plasmodium* presentan un ciclo de vida complejo, con un estadio haploide que involucra múltiples ciclos de multiplicación asexual en el hospedero vertebrado, y un ciclo de reproducción sexual y otro asexual (ooquiste) en el mosquito vector (Cox, 2010) (Figura 1). Los parásitos son transmitidos por distintas especies de mosquitos hembra del género *Anopheles* y tienen un ciclo de vida muy parecido. La infección comienza cuando los esporozoítos, estadio infeccioso, son inyectados al torrente sanguíneo por un mosquito, los esporozoítos llegan al hígado en donde invaden a los hepatocitos; una vez dentro hay una fase de multiplicación asexual (esquizogonia exoeritrocítica), resultando en la producción de miles de merozoítos que son liberados al torrente sanguíneo. Los merozoítos de *P. falciparum*, *P. malariae* y *P. knowlesi* en el torrente sanguíneo invaden a los eritrocitos, mientras que los de *P. vivax* y *P. ovale* invaden a los reticulocitos (Iyer *et al.*, 2007). Los merozoítos dentro de las células rojas forman un esquizonte eritrocítico iniciando una segunda fase de multiplicación asexual (esquizogonia eritrocítica), resultando en la liberación de 8 a 16 merozoítos por eritrocito infectado, estos merozoítos invadirán nuevos eritrocitos. Este último proceso de invasión se repite indefinidamente y es el responsable de los síntomas del paludismo. Conforme la infección progresa, algunos merozoítos se diferencian a gametocitos masculinos y femeninos que permanecen circulando en el torrente sanguíneo hasta que son absorbidos por

un nuevo mosquito al alimentarse de sangre. Una vez dentro del mosquito los gametocitos maduran en gametos aptos para la fertilización, ésta da paso a la formación de un cigoto diploide en donde se produce la meiosis y recombinación genética, el resultado de este proceso es un oocineto tetraploide móvil (Janse *et al.*, 1986). En el intestino posterior del mosquito, el oocineto atraviesa el epitelio intestinal y se aloja por debajo de la lámina basal en donde forma un ooquiste, en el ooquiste hay una fase de multiplicación asexual (esporogonia) que resulta en la formación de los esporozoítos haploides. Finalmente, los esporozoítos migran hacia las glándulas salivares del mosquito y cuando el mosquito pique a un nuevo hospedero, estos son inyectados junto con la saliva (Farrar *et al.*, 2013).

P. vivax y *P. ovale* tienen la capacidad de pasar a un estado de dormancia dentro de los hepatocitos (hipnozoítos) (Figura 1) que con el tiempo pueden ser reactivados iniciando una recaída por una multiplicación exoeritrocítica y nuevo ataque de los merozoítos a los reticulocitos en ausencia de un nuevo piquete de mosquito infectado (Greenwood *et al.*, 2005).

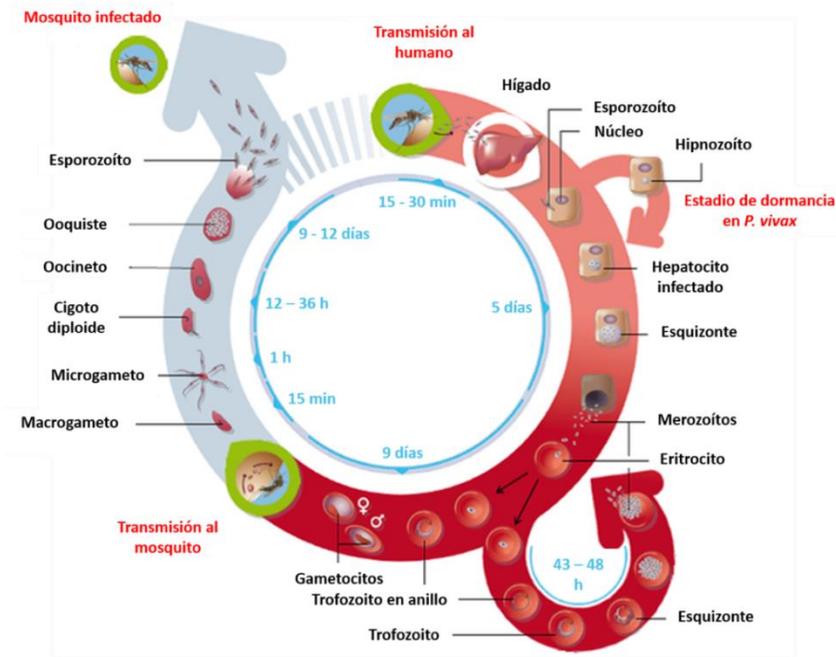


Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. El ciclo de vida de *Plasmodium* es un ciclo complejo que involucra un mosquito vector y un hospedero vertebrado. El ciclo inicia con la alimentación de un mosquito *Anopheles* hembra infectado con esporozoítos de *Plasmodium*, dieciséis días después, aproximadamente, el hospedero vertebrado presenta gametocitos que pueden ser ingeridos por el mosquito vector. Con la ingestión de gametocitos por el vector inicia la segunda parte del ciclo de vida y catorce días después los esporozoítos pueden ser encontrados en las glándulas salivales del vector; el ciclo puede iniciar nuevamente con la picadura del mosquito a un nuevo hospedero (Tomado y modificado de www.mmv.org).

Los síntomas más frecuentes del paludismo no complicado son: fiebre, taquicardia, escalofríos, sudoración, náuseas, vomito, diarrea, anemia, y dolor muscular y de cabeza. Estos síntomas no específicos se pueden presentar en personas que viven o han visitado zonas endémicas (presencia del mosquito vector y del parásito) (Farrar *et al.*, 2013).

2.3. Paludismo causado por *Plasmodium vivax* (paludismo *vivax*).

P. vivax es el parásito causante del paludismo más prevalente fuera del continente africano (Gething *et al.*, 2012) (Figura 2). El paludismo *vivax* es una enfermedad que afecta principalmente a poblaciones humanas que viven en condiciones de pobreza y acceso limitado a los servicios de salud. Los ciclos de fiebre, anemia severa y dificultades respiratorias causados por el paludismo *vivax* son síntomas incapacitantes que llevan a la pérdida de productividad de los adultos y el agotamiento de las reservas financieras de la población, como consecuencia la gente queda atrapada en un ciclo continuo de pobreza (Carlton *et al.*, 2011).

A nivel mundial, se reportan 16 millones de casos de paludismo por año. En Latinoamérica, entre 2010-2016 se reportó una reducción del 17 % en el número de casos y en 2016 se reportaron 556,000 casos. En esta región, *P. vivax* es el responsable del 70 % de los casos. De los 18 países con problemas de paludismo en Latinoamérica, Argentina, Costa Rica y Paraguay están en fase de eliminación, mientras que Belice, el Salvador, Ecuador, República Dominicana y México están en la fase de pre-eliminación, el resto de los países se encuentran en fase de control. *P. vivax* es el causante del 75-100 % de los casos de paludismo en los países en fase de pre-eliminación, excepto en República Dominicana, donde *P. falciparum* es el responsable del 99% de los casos (OMS, 2017).

En África la prevalencia de *P. vivax* es baja (Figura 2). Esto se ha atribuido a la ausencia del receptor Duffy (Fy) en los reticulocitos de las poblaciones humanas de la región. El gen que codifica esta proteína presenta dos alelos (*FyA* y *FyB*), una mutación en la región promotora del gen que codifica para el receptor evita su transcripción resultando en un alelo nulo (*FyA^{ES}*) o (*FyB^{ES}*), y los individuos homocigotos para alelos nulos resultan en un fenotipo nulo Fy(a-b-), es decir, no presentan el receptor (Howes *et al.*, 2011; Zimmerman *et al.*, 2013). Se ha descrito que el receptor Duffy interacciona con la proteína de unión al receptor Duffy de *P. vivax* (PvDBP), la interacción entre estas dos proteínas da inicio al proceso de la invasión (Wertheimer y Barnwell, 1989), por lo que la ausencia del receptor Duffy confiere resistencia contra *P. vivax* (Howes *et al.*, 2011).

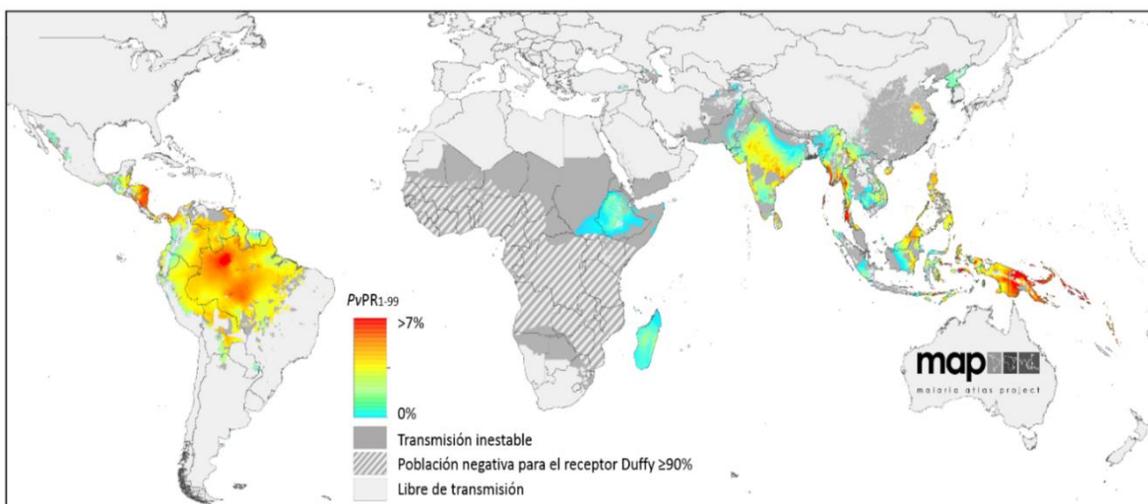


Figura 2. Distribución espacial de zonas endémicas de *P. vivax*. Las zonas endémicas fueron definidas por el promedio anual del índice parasitario de *P. vivax* en individuos en un rango de edad de 1-99 años ($PvPR_{1-99}$). El $PvPR$ es definido como la proporción de individuos muestreados al azar en un censo poblacional con parasitemia evidente en sangre detectada por microscopía o prueba de diagnóstico rápido (RDT). Las zonas de transmisión inestable y libres de transmisión fueron obtenidas con el índice parasitario anual para *P. vivax* ($PvIPA$) el cual se define como el número de casos confirmados por un año entre la población censada (x1000). Las zonas de transmisión inestables se definieron por un valor de $PvIPA < 0.1$ por cada 1000 individuos y para las zonas libres de transmisión un valor de $PvIPA = 0.1$ por cada 1000 individuos. Tomado y modificado de Gething *et al.*, 2012.

P. vivax posee características biológicas que dificultan su control y eliminación:

1) presenta un estadio de dormancia en el hígado (hipnozoíto) responsable de las recaídas, Los patrones de recaída varían según en diferentes latitudes, en regiones tropicales con transmisión persistente las recaídas pueden ocurrir después de días o semanas, mientras que en zonas templadas con transmisión estacional pueden ocurrir en meses o años. Además, los patrones pueden ser influenciados por diferentes factores que aun no comprendemos del todo: inoculación con diferentes cepas del parásito, rangos de inoculación con esporozoítos, respuesta inmune del hospedero, coinfección con otra especie del parásito y/o tratamientos con fármacos. Las recaídas contribuyen a la persistencia de la transmisión y la generación de diversidad (por recombinación de diferentes genotipos en el vector) en regiones endémicas (White, 2011). El medicamento utilizado para eliminar a los hipnozoítos es la primaquina, sin embargo, este medicamento no puede ser aplicado en áreas donde la población es deficiente en la enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) (Bowman *et al.*, 2004). La deficiencia de G6PD es un defecto enzimático heredable que afecta a más de 400 millones de personas

en todo el mundo. Las regiones más afectadas son África, Europa (región del Mediterráneo), sureste de Asia y Suramérica (Howes *et al.*, 2013). En México, la prevalencia de deficiencia de G6PD es de aproximadamente el 1 % (CENETEC, 2016), y la OMS no recomienda una prueba de deficiencia de la enzima antes de la aplicación del tratamiento con primaquina (OMS, 2017).

2) invade a los reticulocitos, resultando en parasitemias bajas en sangre que pueden escapar al diagnóstico. La población de reticulocitos en el ser humano es de 0.5-1.5 % del total de las células rojas circulantes, por lo tanto, el número de merozoítos liberados es más bajo que el número de merozoítos liberados por *P. falciparum* que infecta a los eritrocitos. Además, el umbral pirogénico (concentración de parásitos en sangre necesaria para producir síntomas) de *P. vivax* es bajo (aproximadamente 181 parásitos/ μ l) en comparación con el de *P. falciparum* (aproximadamente 1,460 parásitos/ μ l), de tal manera que cuando aparecen los síntomas (2-3 días después de la infección) el nivel de parásitos en sangre es más difícil de detectar con los métodos de diagnóstico rutinarios (Olliaro *et al.*, 2016): la microscopía puede detectar de 50-500 parásitos/ μ l, pero hay que tomar en cuenta que es laboriosa y tardada, y a menudo operacionalmente inexacta (Wongsrichanalai *et al.*, 2007), y las pruebas de diagnóstico rápido (RDTs) para *P. vivax* pueden detectar de 200-500 parásitos/ μ l (Olliaro *et al.*, 2016).

3) desarrolla gametocitos en etapas tempranas de la infección, cuando aún no se presenta el cuadro clínico. En *P. falciparum* los gametocitos aparecen en circulación de 10-14 días después de los primeros síntomas, mientras que en *P. vivax* aparecen al tercer día después de la primera aparición de los merozoítos. La infección con *P. falciparum* puede ser detenida iniciando el tratamiento después de la aparición de los síntomas y el diagnóstico, ya que para este momento los gametocitos aun no circulan en el torrente sanguíneo. En el caso de *P. vivax*, el diagnóstico no previene la transmisión, ya que para cuando los síntomas aparecen la circulación de gametocitos ya ha iniciado (su aparición es inmediata a la aparición de los merozoítos) y consigo la probabilidad de transmisión (Bousema y Drakeley, 2011; Olliaro *et al.*, 2016).

4) es transmitido por un número amplio de especies de mosquitos vectores (anofelinos). Se han identificado 71 especies de mosquitos anofelinos que pueden ser potenciales transmisores de *P. vivax*, la mayor diversidad se encuentra en Asia y América. (Battle *et al.*, 2012). Los hábitos alimenticios de esos mosquitos son diversos, la mayoría son endofágicos y exofílicos, es decir que entran a las viviendas a alimentarse y salen antes del amanecer, y

durante el día permanecen fuera de las viviendas; por ejemplo, *Anopheles dirus* en el sureste de Asia y *An. farauti* en Oceanía (Sinka, 2013). Otras especies han modificado sus hábitos y se han adaptado a su entorno, en África, *An. gambiae* y *An. arabiensis* se consideran exofílicas y zoofílicas (preferencia por alimentarse de animales), pero también se ha reportado como antropofílicas y endofágicas. Por otra parte, *An. darlingi* en Suramérica puede ser endo- o exofágica, se ha propuesto que la forma de alimentarse de esta especie es una adaptación a las conductas humanas (Sinka, 2013; Vector Base, 2018). La gran diversidad de mosquitos vectores da la posibilidad de que *P. vivax* tenga más opciones de adaptación, por ejemplo, a los mosquitos que habitan cerca de grandes asentamientos humanos (por ejemplo, *An. stephensi* en la India (Sharma *et al.*, 1999)), o por la especificidad en la infectividad según la cepa del parásito (por ejemplo, *An. albimanus* y *An. pseudopunctipennis* en México (Gonzalez-Ceron *et al.*, 1999)). La variabilidad de los hábitos de los mosquitos dificulta su control y consigo la transmisión del parásito, diferentes métodos de control deben de ser aplicados según los hábitos de los mosquitos, por ejemplo, las especies exofílicas son menos afectadas por las medidas de intervención convencionales como los rociamientos internos y mayas impregnadas con insecticidas (Battle *et al.*, 2012; Sinka, 2013; Bassat *et al.*, 2016).

2.4. El genoma de *Plasmodium vivax*.

Los estudios genómicos en *P. vivax* han avanzado lentamente ya que el parásito no puede ser cultivado *in vitro*, las muestras clínicas de paludismo *vivax* presentan bajas parasitemias, y no hay acceso a modelos animales, los primates de los géneros *Aotus* y *Saimiri* pueden servir como hospedero para reproducir al parásito, pero son raros y costosos. A pesar de las dificultades, el primer genoma de *P. vivax* se obtuvo en 2008 a partir de una cepa aislada de un paciente de La Paz en El Salvador y adaptada a primates (Salvador I; (*Sal-I*)) (Carlton *et al.*, 2008), este genoma completamente ensamblado es el más utilizado como referencia y ha permitido el estudio de las bases genéticas de *P. vivax*.

Actualmente, las estrategias para la concentración de parásitos y/o eliminación del ADN humano en muestras de sangre infectada y el incremento de la sensibilidad de las tecnologías de secuenciación a cantidades de ADN cada vez menores, han contribuido a lograr obtener múltiples genomas de *P. vivax* (Dharia *et al.*, 2010; Auburn *et al.*, 2016; Hupalo *et al.*, 2016; Pearson *et al.*, 2016; Winter *et al.*, 2016; de Oliveira *et al.*, 2017; Cowell *et al.*, 2018). El aumento de la información genómica ha contribuido a mejorar el conocimiento de las bases biológicas y evolutivas del parásito, y de manera paralela se ha avanzado en la detección de regiones bajo presión de selección natural relacionadas con la resistencia a fármacos (Hupalo

et al., 2016; Parobek *et al.*, 2016; Pearson *et al.*, 2016; Winter *et al.*, 2016; de Oliveira *et al.*, 2017; Cowell *et al.*, 2018).

El genoma más completo de *P. vivax* es de aproximadamente 29 Mb, el contenido de guanina (G) y citocina (C) es de aproximadamente 40% y contiene alrededor de 6,600 genes distribuidos en 14 cromosomas, más del 50% de los genes contienen intrones (Carlton *et al.*, 2008; Tachibana *et al.*, 2012; Auburn *et al.*, 2016; Pearson *et al.*, 2016).

2.5. Procesos evolutivos que determinan la diversidad genética en las poblaciones.

La variación genética que presentan los organismos en una población es originada por mutaciones al azar, dicha variación aumenta por flujo génico y recombinación, y es mantenida por selección natural y deriva génica. El estudio de los cambios evolutivos en las poblaciones de *P. vivax* nos permitirá detectar la dispersión de variantes alélicas de genes candidatos para vacunas, y genotipos de resistencia a drogas o relacionados con recaídas (Brito y Ferreira, 2011; Rice *et al.* 2013).

2.5.1. Mutación.

La mutación es la fuente primaria de variabilidad genética. Hay dos tipos de mutaciones: puntuales, es el reemplazo de un nucleótido por otro en el genoma; y cromosómica, que afecta la estructura de los cromosomas. Además, las mutaciones pueden ser recurrentes (aparecen con una cierta tasa) o no recurrentes (ocurren una sola vez). Las mutaciones puntuales como transiciones y transversiones suelen ser recurrentes ya que pueden ocurrir con cierta frecuencia (tasa de mutación). En ocasiones estas mutaciones pueden ocurrir en el mismo nucleótido, así que pueden ser reversibles o irreversibles, siendo diez veces más comunes las irreversibles. Si la sustitución ocurre dentro de regiones codificantes ésta puede o no modificar al codón, así, las mutaciones pueden ser sinónimas o silenciosas cuando no modifican al codón y no sinónimas cuando modifican al codón (Hamilton, 2009). Por otra parte, dentro de las mutaciones cromosómicas podemos encontrar inserciones y deleciones (indels). Las indels pueden variar en sus longitudes, de un nucleótido hasta regiones cromosómicas de miles de nucleótidos. Cuando los indels son de pocos nucleótidos pueden generar desplazamiento del marco de lectura en regiones codificantes, pero cuando involucran grandes regiones (inversiones y translocaciones) generan reordenamientos cromosómicos. Las inversiones y translocaciones se consideran no recurrentes, ya que es muy poco probable que se repita un reordenamiento cromosómico en los mismos sitios (Clancy, 2008; Loewe, 2008).

La tasa de mutación puede ser definida como la probabilidad de que ocurra una mutación por generación en un organismo específico. Por ejemplo, la tasa de mutación en organismos unicelulares como bacterias está en el orden de 10^{-8} a 10^{-10} /nucleótido/replicación, mientras que en los seres humanos y otros organismos pluricelulares está en el rango de 10^{-10} - 10^{-11} /nucleótido/generación sexual. (Hamilton, 2009). Hay que tomar en cuenta que algunas regiones del genoma son más propensas que otras a las mutaciones (puntos calientes), por ejemplo, regiones repetidas en donde pueden generarse mutaciones durante la replicación, o regiones génicas que pueden acumular mutaciones benéficas para el organismo. Estos eventos hacen que la tasa de mutación pueda variar dentro del genoma y dentro de los genes (Clancy, 2008; Loewe, 2008).

2.5.2. Flujo génico y recombinación.

El flujo génico es el intercambio de genes de una población a otra, así, los genes característicos de una población pueden ser establecidos en el acervo genético de otra (Futuyma, 1998). El flujo génico puede ser estimado por la tasa de migración (probabilidad de que un gen tomado al azar de una población sea un migrante) y es un componente esencial en la estructura de las poblaciones, a mayor flujo génico menor estructura poblacional y viceversa.

Las poblaciones raramente son sistemas cerrados, por lo regular, hay una cierta transferencia de genes, y aumenta cuando las poblaciones se hallan estrechamente relacionadas geográfica y genéticamente. Cuando las poblaciones son cercanas geográficamente el flujo de genes puede ser grande, es de esperar que las poblaciones contiguas posean una composición genética semejante que las que están alejada geográficamente. En poblaciones geográficamente aisladas el flujo génico es un evento de gran importancia ya que altera las frecuencias alélicas, y en general, todas las diferencias genéticas entre las poblaciones se reducen. La eficacia del intercambio de material genético entre dos poblaciones (migrante y receptora) depende de la tasa de migración y de que tan grande sea la diferencia entre sus frecuencias génicas.

En un sentido amplio, la recombinación es el intercambio de material genético entre dos genomas. Mientras la mutación introduce nuevas variantes alélicas a la población, la recombinación genera nuevas combinaciones de las variantes existentes. En organismos eucariontes, durante la meiosis, la recombinación puede ocurrir por segregación independiente de genes en diferentes cromosomas (segunda ley de Mendel) y por entrecruzamiento (*crossing-over*). En la segregación independiente hay un ordenamiento de

las cromátidas hermanas antes de la haploidización en la mitosis II, sin que ocurra entrecruzamiento de DNA entre cromosomas, este proceso siempre produce el 50 % de genotipos recombinantes. Mientras que el entrecruzamiento entre genes homólogos en cromátidas no hermanas, el porcentaje de recombinantes puede variar entre el 0 y 50 % ya que durante este proceso es posible que dos genes homólogos no se encuentren o que intercambien fragmentos de ADN de tamaño variable (Griffiths *et al.*, 2000).

Las consecuencias evolutivas de la recombinación son: 1) la generación de nuevas variantes alélicas a partir de los alelos parentales (Milgroom, 1996); 2) la generación de nuevos genotipos permitirá la dispersión de múltiples mutaciones potencialmente benéficas (Fisher, 1932; Muller, 1932) o de interés médico como fenotipos de virulencia, resistencia a fármacos o enfermedades genéticas; y 3) se rompe la correlación genealógica entre diferentes regiones de un genoma; es decir, el ligamiento entre los genes (McVean *et al.*, 2002).

2.5.3. Selección natural.

La selección natural es la explicación para muchos caracteres adaptativos de los organismos. El principal supuesto inherente a la teoría de la selección natural es que algunos tipos hereditarios de una población tienen una cierta ventaja sobre otros para adaptarse a los cambios ambientales, ya sea por su mayor supervivencia y/o capacidad reproductora (Hamilton, 2009).

La consecuencia primaria de la selección natural en las poblaciones es el cambio de las frecuencias génicas (Futuyma, 1998; Li, 1997). Como ya se mencionó, la mutación genera nuevos cambios en el genoma de un organismo, estos nuevos cambios, pueden favorecer o perjudicar la capacidad de supervivencia de un individuo. A nivel molecular la selección natural puede ser positiva, negativa o balanceadora. En la selección positiva las mutaciones nuevas proporcionan adecuaciones mayores que el promedio de la población y las frecuencias alélicas de estas mutantes tenderán a aumentar, mientras en la selección negativa las nuevas mutaciones disminuyen la adecuación promedio de la población y las frecuencias alélicas de estas mutantes tenderán a disminuir o desaparecer de la población. Estos dos tipos de selección tendrán un efecto negativo en la diversidad genética por la fijación y/o pérdida de alelos. Por otra parte, la selección balanceadora, promueve la diversidad alélica, ya que los alelos mutantes no afectan la adecuación promedio de la población (Li, 1997). Este tipo de selección tendrá un efecto positivo en la diversidad genética, ya que los individuos heterocigotos tienen la mayor capacidad de adaptación y de esta manera la selección mantiene diferentes alelos dentro de la población.

2.5.4. Deriva génica.

La deriva génica se refiere a las fluctuaciones al azar en las frecuencias alélicas. Las poblaciones constan de un número limitado de individuos (población finita), por lo que los cambios en sus frecuencias alélicas dependerán del número de descendientes por individuo. Cuanto mayor sea el número de progenitores que dan origen a la siguiente generación, mayor probabilidad habrá de observar una igualdad entre las frecuencias alélicas de la generación descendiente y la generación parental, es decir, el efecto de la deriva génica será menor. Por el contrario, cuanto menor es el número de progenitores en la población, probablemente las frecuencias alélicas de la siguiente generación se desviarán de las generaciones predecesoras y los efectos de la deriva génica serán mayores (Gillespie, 1998). También hay que tomar en cuenta que la deriva génica es un caso particular de los errores de muestreo, y la magnitud de estos errores es proporcional al tamaño de muestra.

La deriva génica afecta a la evolución de dos maneras: actúa como fuerza dispersora que tiende a la eliminación de alelos raros o menos frecuentes, y como consecuencia se genera una disminución de la diversidad genética en la población, este efecto es inversamente proporcional al tamaño de la población. Por otra parte, afecta la probabilidad de que una mutación se fije, es decir que una mutación tiene la misma probabilidad de que se fije o elimine, independientemente del tamaño de la población (Gillespie, 1998).

2.6. Marcadores moleculares para el estudio de la genética de poblaciones en *Plasmodium vivax*.

La genética de poblaciones se puede definir como la cuantificación de la variabilidad genética mediante la descripción de los cambios de las frecuencias alélicas. Aunque resulta prácticamente imposible investigar todas las variables genéticas presentes en una población, se puede estudiar a la población a través de la variación de fenotipos individuales (rasgos morfológicos y fisiológicos) o de sus genotipos (marcadores moleculares).

Los estudios de genética de poblaciones de *P. vivax* a nivel local, regional y global han generado información útil para entender las dinámicas de transmisión, diversidad genética y la vigilancia epidemiológica molecular (Arnott *et al.*, 2012). Los estudios de la complejidad de las infecciones, es decir, el número de genotipos en una infección, permiten examinar la diversidad genética entre las diferentes clonas presentes en una infección y a distinguir si una infección es resultado de una recaída o una nueva infección, siempre tomando en cuenta que es posible que la infección inicial sea producida por parásitos genéticamente diferentes produciendo hipnozoítos diferentes y las recaídas pueden ser diferentes al que produjo la

parasitemia inicial. Además, siempre es posible que haya reinfecciones con el mismo genotipo circulante. También, han generado conocimiento sobre los tiempos de latencia de los hipnozoítos y las frecuencias de las recaídas, que pueden modificar las dinámicas de transmisión. Por otra parte, el análisis de marcadores bajo selección natural como candidatos para vacunas o de resistencia a fármacos, son útiles para detectar nuevas mutaciones y sus dispersiones a través de diferentes regiones geográficas, la vigilancia epidemiológica molecular basada en esos marcadores permitirá que los programas de control hagan un mejor ajuste en el diseño de vacunas y en los regímenes de aplicación de fármacos. Finalmente, el conocimiento de la estructura poblacional del parásito y sus relaciones genealógicas dentro y entre regiones permitirá la identificación de los linajes existentes en cada región, si los parásitos pueden ser genotipados a su lugar de origen, los casos locales e importados pueden ser teóricamente detectados, mejorando los programas de vigilancia epidemiológica molecular (Daniels *et al.*, 2015).

Diversos estudios de genética de poblaciones en *P. vivax* han utilizado diferentes clases de marcadores moleculares, a continuación, se hace una breve revisión de cada uno de ellos y su utilidad en los análisis de genética de poblaciones según sus características.

2.6.1. Microsatélites.

Los microsatélites son secuencias de 2-6 nucleótidos que se repiten de manera consecutiva. Se estima que en el genoma de *P. vivax* hay aproximadamente 240 microsatélites con una longitud promedio de 3.1 nucleótidos y un número de copias promedio de 19.1, y presentan 1-7 alelos por locus. El 76 % de ellos son perfectos (con un solo tipo de unidad repetitiva en tándem), el resto son compuestos (con más de un tipo de unidad repetitiva) o imperfectos (con unidades repetitivas con nucleótidos intercalados). Sus distribuciones son heterogéneas entre los 14 cromosomas, la mayor densidad se encuentra en los cromosomas 9 y 14 y la menor en los cromosomas 1 y 4 (Carlton *et al.*, 2008; Brito y Ferreira, 2011). Presentan una tasa de mutación de 1×10^{-3} a 1×10^{-4} /locus/generación (Orjuela-Sánchez *et al.*, 2013).

Los microsatélites son marcadores polimórficos, el número de variación genética que presentan depende de su longitud, va de moderada a alta (Gomez *et al.*, 2003; Leclerc *et al.*, 2004; Imwong *et al.*, 2006; Rezende *et al.*, 2010). Además, se consideran selectivamente neutrales, a menos que estén localizados cerca de genes bajo selección (vinculados), por ejemplo, genes con mutaciones que confieran resistencia a drogas (Cheeseman *et al.*, 2012). Los microsatélites moderadamente polimórficos se utilizan, principalmente, para estimar la diversidad genética (Van den Eede *et al.*, 2010; Waltmann *et al.*, 2018) y para caracterizar la

estructura poblacional (Joy *et al.*, 2008; Iwagami *et al.* 2013; Batista *et al.* 2014; Delgado-Ratto *et al.* 2014; Koepfli *et al.* 2015). Mientras que los microsatélites altamente polimórficos se utilizan para detectar el número de clonas en una muestra (infecciones múltiples) (Imwong *et al.*, 2007; Gunawardena *et al.*, 2010) y diferenciar entre recaídas e infecciones nuevas (Orjuela-Sánchez *et al.*, 2009; Restrepo *et al.*, 2011; Gonzalez-Ceron *et al.*, 2013).

Análisis con microsatélites a nivel global han demostrado que *P. vivax* es genéticamente más diverso y con menor estructura poblacional que *P. falciparum* (Koepfli *et al.*, 2015). La diversidad genética de *P. falciparum* está asociada directamente con la intensidad de la transmisión (Barry *et al.*, 2015), en *P. vivax* no hay una relación clara entre la intensidad de la transmisión y los niveles de diversidad. En regiones de alta transmisión del sureste de Asia y Oceanía la diversidad genética es alta (Orjuela-Sánchez *et al.*, 2013; Jennison *et al.*, 2015; Koepfli *et al.*, 2015), pero ha observado que en regiones de baja transmisión de Sudamérica, Europa y Asia la diversidad genética no es baja, por ejemplo, en Brasil y Sri Lanka se observó una alta diversidad genética y alto número infecciones múltiples (Ferreira *et al.*, 2007; Gunawardena *et al.*, 2014), y en Grecia se presentó una alta diversidad, pero un bajo número de infecciones múltiples (Spanakos *et al.*, 2018). Por otra parte, en Indonesia y Papúa Nueva Guinea en donde la transmisión es alta se observó una diversidad genética alta y gran número de infecciones múltiples, pero en Indonesia no se observó estructura poblacional, mientras que en Papúa Nueva Guinea si se observó estructura (Pava *et al.*, 2017; Fola *et al.*, 2018). Finalmente, en las islas del Pacífico en donde hay regiones de transmisión alta, media y baja se observó que con la reducción en el número de casos aumentó la estructura poblacional pero solo hubo una ligera reducción en la diversidad genética (Waltmann *et al.*, 2018). La heterogeneidad que presenta *P. vivax* en su diversidad genética a lo largo de diferentes regiones geográficas sugiere que tiene un tamaño efectivo poblacional estable, esta observación y sus características biológicas podrían ser factores que dificultan su control y eliminación.

2.6.2. Polimorfismos de un simple nucleótido (SNPs).

Los SNPs son variaciones en las secuencias de ADN que afectan a un solo nucleótido. La distribución de los SNPs en el genoma nuclear de *P. vivax* no es uniforme, la mayoría de ellos se localizan en las regiones subteloméricas, y su proporción es de aproximadamente 50/50 en regiones codificantes/no codificantes (Carlton *et al.*, 2008; Pearson *et al.*, 2016). Los SNPs en regiones codificantes han demostrado la evolución de *P. vivax* por selección natural, por ejemplo, comparaciones de genes ortólogos de *P. vivax* y *P. cynomolgi* han permitido identificar genes bajo selección natural positiva-diversificadora, incluyendo genes involucrados

en la evasión del sistema inmune del hospedero (Carlton *et al.*, 2008; Cornejo *et al.*, 2014), y en genes de resistencia a fármacos (Winter *et al.*, 2015; Hupalo *et al.*, 2016; Pearson *et al.*, 2016; de Oliveira *et al.*, 2017). Esos resultados sugieren que la evolución de *P. vivax* ha sido influenciada por sus interacciones con el hospedero y la presión de selección con fármacos.

Los SNPs en regiones no codificantes y genes conservados se consideran selectivamente neutros y presentan una tasa de mutación más lenta ($1-10 \times 10^{-9}$ /nucleótido/sitio/generación) que la de los microsatélites (Paget-McNicol y Saul, 2001). Por tales razones se han utilizado para caracterizar la estructura poblacional de *P. vivax*. Al igual que con los microsatélites, los SNPs han demostrado que *P. vivax* es menos estructurado que *P. falciparum* (Neafsey *et al.*, 2012). Recientes análisis genómicos han agrupado a las poblaciones de *P. vivax* en dos: las del viejo mundo (Asia) y las del nuevo mundo (América) (Hupalo *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017). Análisis regionales también han demostrado estructura, por ejemplo, dentro del sureste de Asia-Oceanía se detectó una estructuración alta (tres subpoblaciones bien definidas) (Pearson *et al.*, 2016). Por otra parte, entre regiones de baja transmisión de América se detectó una baja-media estructura, en donde México y Brasil forman poblaciones bien definidas, mientras que Perú y Colombia son poblaciones similares (de Oliveira *et al.*, 2016). Por el contrario, un análisis local en el noreste de Perú demostró baja estructura poblacional, sugiriendo flujo génico entre las localidades analizadas (Cowell *et al.*, 2018).

Las observaciones anteriores son de gran importancia para la vigilancia epidemiológica y la determinación del origen de los parásitos. Si los parásitos pueden ser genotipados a su lugar de origen, los casos locales e importados pueden ser teóricamente diferenciados. En este contexto, el aumento del número de SNPs reportados para *P. vivax* ha permitido comenzar con el desarrollo de un código de barras molecular (Baniecki *et al.*, 2015) como ya se hizo previamente en *P. falciparum* (Daniels *et al.*, 2008), esto permitirá hacer estudios comparativos más amplios (regionalmente) sobre la estructura poblacional.

2.6.3. ADN mitocondrial.

El genoma mitocondrial de *P. vivax* tiene un tamaño de 6 Kb (Wilson *et al.*, 1997), está integrado por cinco genes, tres que codifican para proteínas involucradas en la respiración celular, citocromo c oxidasa subunidad I (*coxI*) y subunidad III (*coxIII*) y el citocromo b (*citb*), y dos correspondientes a la subunidad pequeña (SSU) y grande (LSU) del ARN ribosomal (ARNr) (Feagin *et al.*, 1997).

El ADN mitocondrial evoluciona mucho más lentamente (4×10^{-3} sustituciones/sitio/millón de año) que los microsatélites y SNPs presentes en regiones no codificantes, y es más susceptible a los cambios en el tamaño de la población y deriva génica. Estas características lo hacen buen marcador para inferir la evolución y el pasado demográfico de las poblaciones, así como estimar cambios en la estructura poblacional entre regiones (Culleton *et al.*, 2011; Miao *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2013). Además, al ser heredado de manera uniparental permite determinar relaciones genealógicas y procesos de diversificación de manera histórica (Jongwutiwes *et al.*, 2005; Mu *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2013).

Análisis con el genoma mitocondrial de *P. vivax* proponen la hipótesis de que su origen tuvo lugar en Asia (Escalante *et al.*, 2005; Mu *et al.*, 2005; Cornejo y Escalante, 2006). La hipótesis sugiere que después de que las poblaciones de primates incrementaron y comenzaron a sobrelaparse geográficamente en el sureste de Asia hace 3.5-4.7 millones de años (ma) hubo una radiación adaptativa de parásitos de primates no humanos. Posteriormente, hubo un salto de los parásitos de los primates (probablemente de un macaco) a homínidos hace 200-300 mil años (Cornejo y Escalante, 2006). Esta hipótesis es apoyada por análisis filogenéticos que han ubicado a *P. vivax* en un grupo monofilético del género *Plasmodium* que parasitan a Cercopitécidos del género *Macaca* (monos del viejo mundo), y a su vez este grupo monofilético es genealógicamente cercano a otro grupo de parásitos que infectan a Cercopitécidos del género *Cercocebus* (Figura 3) (Escalante *et al.*, 1998; Escalante *et al.*, 2005; Mu *et al.*, 2012).

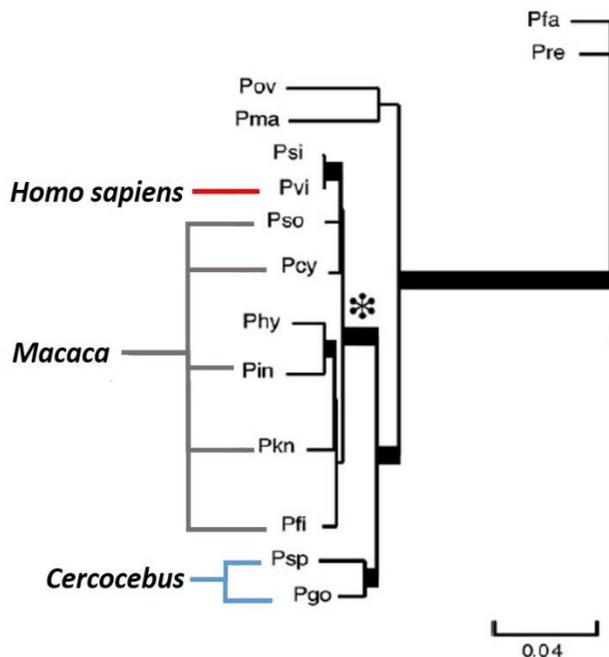


Figura 3. Árbol filogenético de parásitos del género *Plasmodium* y sus hospederos primates. El árbol filogenético de *Plasmodium* fue inferido a partir del genoma mitocondrial completo de diferentes especies: *P. falciparum*, Pfa; *P. reichenowi*, Pre; *P. ovale*, Pov; *P. malariae*, Pma; *P. simium*, Psi; *P. vivax*, Pvi; *P. simiovale*, Pso; *P. cynomolgi*, Pcy; *P. hylobates*, Phy; *P. inui*, Pin; *P. knowlesi*, Pkn; *P. fieldi*, Pfi; *P. sp* (mandril), Psp y *P. gonderi*, Pgo. El asterisco indica el clado de parásitos asiáticos. Los taxones asociados están unidos por las líneas de diferentes colores. Tomado y modificado de Mu *et al.*, (2012).

Además, la especie genéticamente más cercana a *P. vivax* es *P. cynomolgi*, especie que parasita principalmente a macacos del sureste de Asia (Sutton *et al.*, 2016), estos dos parásitos pudieron haber divergido hace 1.3 ma, cuando diferentes poblaciones de *Macaca* y *Homo erectus* estaban en expansión geográfica (Pacheco *et al.*, 2012). Los análisis filogenéticos son apoyados por inferencias evolutivas basadas en rasgos biológicos entre las dos especies: ambos parásitos tienen la capacidad de pasar a un estado de dormancia (hipnozoíto), tienen preferencia por invadir a los reticulocitos, una temprana formación de gametocitos y modificación de las membranas de los eritrocitos infectados (granulado de Schuffner) (Revisado en Sutton *et al.*, 2016). Además, el contenido de G+C en sus genomas son muy similares (McCutchan *et al.*, 1984). Finalmente, la hipótesis de que la transmisión inicial de *P. vivax* haya sido una zoonosis por macacos es apoyada por reportes en donde *P. knowlesi* (parásito de macacos de Asia) también infecta humanos en condiciones de transmisión natural (Singh *et al.*, 2004).

Estudios recientes han demostrado que la población global de *P. vivax* está en una expansión demográfica desde hace 30-60 mil años (Taylor *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2018). La expansión en Suramérica se ha atribuido a eventos sucesivos de introducción de parásitos provenientes de África y el sur de Asia y posterior recombinación y diversificación local (Rodrigues *et al.*, 2018). Aunque no se tiene claro cómo *P. vivax* llegó a América, la hipótesis más aceptada sugiere que los parásitos de Suramérica descienden de los linajes europeos extintos. En Europa los linajes de *P. vivax* provenientes de África y Asia lograron diversificarse y diferenciarse de sus contrapartes en esos continentes y posteriormente fueron traídos a Suramérica con los viajes post-colombinos, estando en América se diversificaron de manera local (Culleton *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2013; Gelabert *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2018). Por otra parte, se sugiere que las poblaciones de *P. vivax* de Suramérica pudieron haberse desplazado desde Oceanía, se sugiere que los hipnozoítos fueron capaces de sobrevivir a los largos viajes oceánicos precolombinos desde el este del Pacífico hasta Suramérica a través de la ruta Kon-Tiki (Carter *et al.*, 2003), un estudio reciente apoya este supuesto al reportar significativo flujo génico de las poblaciones de *P. vivax* de Oceanía a América (Rodrigues *et al.*, 2018).

2.6.4. Genes que codifican proteínas antigénicas.

En las diferentes especies de *Plasmodium* los genes más polimórficos son aquellos que codifican para proteínas expuestas en la superficie del parásito. Estas proteínas están expuestas directamente al sistema inmune del hospedero y en un constante proceso de coevolución que genera patrones distintivos de polimorfismos en las proteínas del parásito

(Mu *et al.*, 2007; Volkman *et al.*, 2007). Estas características permiten identificar señales de selección natural e identificar potenciales candidatos para el desarrollo de vacunas (Weedall y Conway, 2010; Cowman *et al.*, 2012). Además, su alto polimorfismo y muchos alelos en frecuencias moderadas ha ayudado a determinar el número de clonas por muestra y la diversidad genética (Koepfli *et al.*, 2011; de Araujo *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2012).

Diversos estudios han evaluado genes que codifican proteínas antigénicas en la búsqueda de candidatos para vacunas contra *P. vivax*. Hay proteínas en tres fases del ciclo de vida del parásito que podrían ser blancos efectivos para la activación de la respuesta inmune: en el esporozoíto, proteína de superficie del esporozoíto (CSP) (Hernandez-Martinez *et al.*, 2011; Chenet *et al.*, 2012; Bennett *et al.*, 2016), proteína anónima asociada a trombospondina (TRAP) (Bauza *et al.*, 2014) (Figura 4); en el merozoíto, proteína de unión al receptor Duffy (DBP) (de Cassan *et al.*, 2015; Ntumngia *et al.*, 2012), proteínas de superficie del merozoíto 1 (MSP1) (Rosa *et al.*, 2006; Pacheco *et al.*, 2007), y el antígeno de la membrana apical 1 (AMA1) (Bouillet *et al.*, 2011; Vicentin *et al.*, 2014) (Figura 4); y en el oocineto, los antígenos para del bloqueo de la transmisión 25 y 28 (Pvs25 y Pvs28) en el mosquito vector (Hisaeda *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2011).

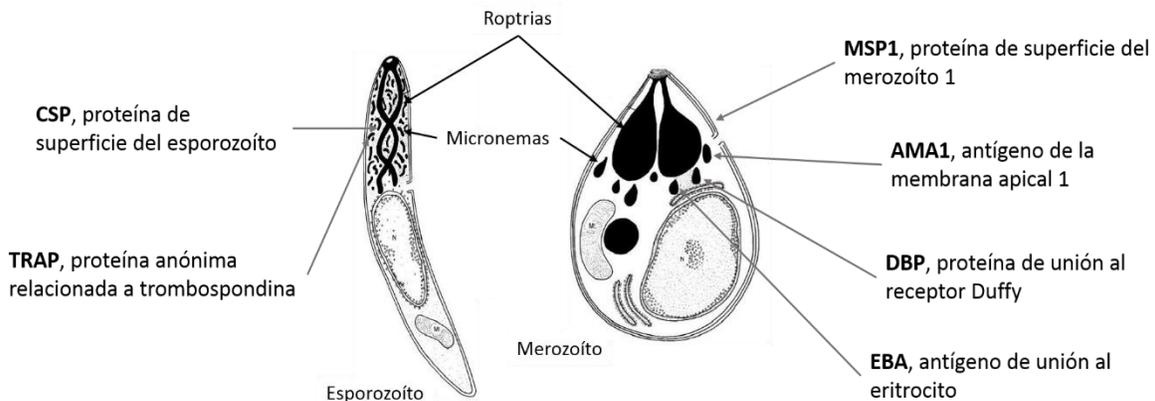


Figura 4. Esquema del esporozoíto y merozoíto, y sus principales proteínas candidatas a vacunas. Las roptrias y meronemas de ambos estadios son los organelos en donde se sintetizan y almacenan las principales proteínas involucradas en la adhesión e invasión del eritrocito. Estas proteínas se pueden clasificar como: adhesinas que funcionan como ligandos que interaccionan con receptores del eritrocito, como CSP, MSP1, DBP y EBA; e invasinas que participan directamente en el proceso de invasión del reticulocito, aunque no necesariamente por la interacción con un receptor del hospedero, como el caso de AMA1 (Cowman *et al.*, 2012).

La proteína de la superficie del merozoíto 1 (PvMSP-1) y el antígeno de la membrana apical 1 (PvAMA-1) participan en el proceso de invasión de los reticulocitos. La proteína MSP-1

participa en la adhesión inicial del merozoíto al reticulocito y la proteína AMA-1 en la reorientación de la parte apical del merozoíto y en la formación de las uniones estrechas que permitirán al merozoíto iniciar la invasión del reticulocito (Figura 5) (Wright y Rayner, 2014). Se ha reportado que ambos antígenos están bajo fuerte presión selectiva por el sistema inmune del hospedero, y estudios inmuno-epidemiológicos han demostrado una respuesta con anticuerpos alelo-específica asociada con protección, considerándose buenos candidatos para el desarrollo de vacunas (Weedall y Conway, 2010).

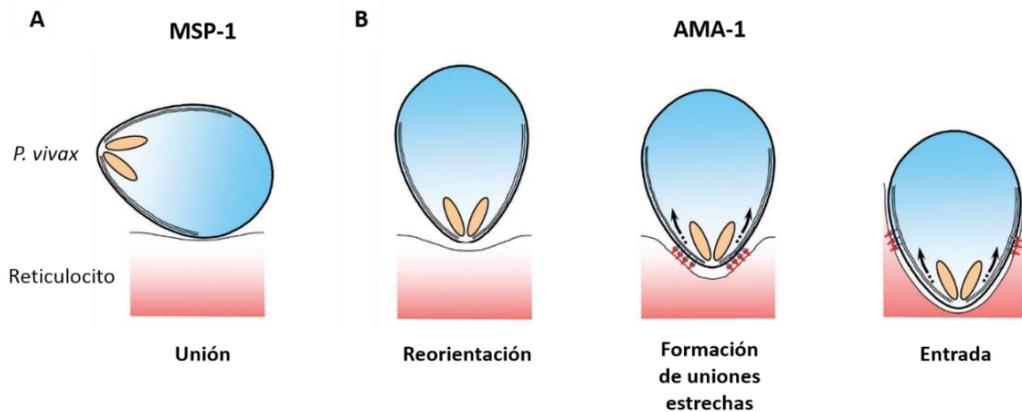


Figura 5. Invasión del reticulocito por *Plasmodium vivax*. Las diferentes etapas de la invasión del reticulocito. **A.** Representación de la unión del merozoíto a un reticulocito, este proceso es mediado por la interacción de diversas proteínas en la superficie de ambas células, entre ellas MSP-1. **B.** Representación de la reorientación e invasión del reticulocito por el merozoíto. Inmediatamente después de la unión del merozoíto comienza la reorientación de la parte apical del merozoíto, la cual se yuxtapone directamente a la membrana del reticulocito. Esta posición le permite al merozoíto comenzar con la secreción de toda la maquinaria proteica que formará las uniones estrechas que le permitirán la invasión. Las uniones estrechas pasarán, en forma de cinturón, alrededor del merozoíto. La invasión termina cuando las uniones estrechas llegan a la parte posterior del merozoíto y este queda internalizado en una vacuola parasitófora. Tomado y modificado de Wright y Rayner, (2014).

2.6.4.1. Proteína de superficie del merozoíto 1 de *Plasmodium vivax* (*pvmsp1*).

El gen que codifica para la proteína de superficie del merozoíto 1 de *P. vivax* (PvMSP-1) tiene un tamaño de 5,396 pb y se encuentra en el cromosoma 7. Está compuesto por 19 bloques diferentes (Figura 6A) (del Portillo *et al.*, 1991; Espinosa *et al.*, 2003). PvMSP-1 es la proteína más abundante y funcionalmente conservada en el merozoíto de *P. vivax*, sugiriendo que juega un papel importante en la unión inicial del merozoíto al reticulocito. Es una proteína de 200 kDa sintetizada durante la esquizogonia. En la región C-terminal de su estructura primaria contiene un grupo glucosil-fosfatidil-inositol (GPI) que le permite anclarse a la membrana del

merozoíto (Gerold *et al.*, 1996) y dos dominios parecidos al factor de crecimiento epidermal (EGF) en un arreglo compacto uno a uno (Cowman *et al.*, 2012) que le sirven para la unión al reticulocito (Han *et al.*, 2004). Después de la traducción, PvMSP-1 sufre un procesamiento proteolítico generando fragmentos de diferentes tamaños (82, 30, 38 y 42 kDa) (Figura 6B) (Holder *et al.*, 1992). Durante la invasión del reticulocito PvMSP-1₄₂ es procesado en dos fragmentos de tamaños de 33 y 19 kDa (PvMSP-1₃₃ y PvMSP-1₁₉), PvMSP-1₁₉ es el único fragmento que permanece en la superficie del merozoíto al momento de la internalización en el reticulocito (Blackman *et al.*, 1990).

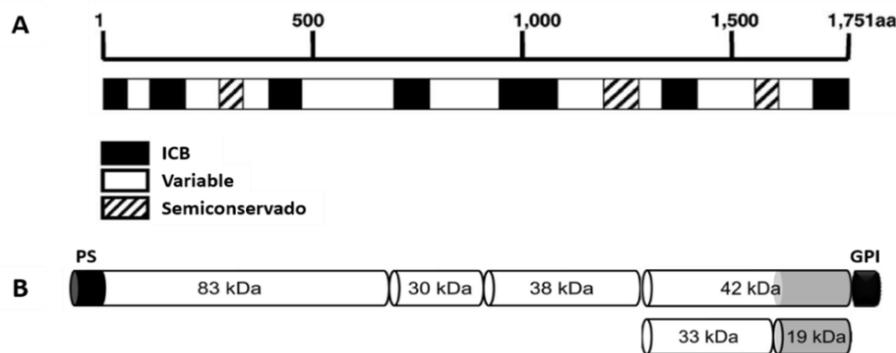


Figura 6. Representación esquemática de la proteína de la membrana del merozoíto 1 de *P. vivax* (PvMSP-1). A. Los diferentes bloques que presenta PvMSP-1 a lo largo de su secuencia de aminoácidos, conservadas entre especies (ICB), variable y semiconservado, fueron obtenidos por la comparación de las secuencias de MSP-1 de *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. yoelli* (del Portillo *et al.*, 1991). B. Fragmentos resultantes del procesamiento post traduccional de PvMSP-1 (PvMSP-1₈₃, PvMSP-1₃₀, PvMSP-1₃₈ y PvMSP-1₄₂). El fragmento PvMSP-1₄₂ presenta una región conservada (sombreada en color gris) correspondiente al fragmento PvMSP-1₁₉ y una región más variable correspondiente al fragmento PvMSP-1₃₃. PS, péptido señal; GPI, glucosil-fosfatidil-inositol; aa, aminoácidos. Tomado y modificado de Espinosa *et al.*, 2003 y Cheng *et al.*, 2013.

El fragmento PvMSP-1₁₉ es más conservado que el fragmento PvMSP-1₃₃, en este último se ha detectado selección natural balanceadora (Kang *et al.*, 2012; Parobek *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2017). Por otra parte, en humanos expuestos de manera natural a *P. vivax* se ha detectado anticuerpos en respuesta a PvMSP-1₄₂ y PvMSP-1₁₉, sugiriendo activación de la respuesta inmune por esta proteína (Wickramarachchi *et al.*, 2007; Riccio *et al.*, 2013; Xia *et al.* 2015; Cassiano *et al.*, 2016; Longley *et al.*, 2017). Además, un estudio clínico longitudinal sugiere protección adquirida por anticuerpos contra PvMSP-1₁₉ al detectar títulos altos de anticuerpos en pacientes asintomáticos, mientras que en pacientes sintomáticos detectaron títulos bajos de anticuerpos (Nogueira *et al.*, 2006).

2.6.4.2. Antígeno de la membrana apical 1 de *Plasmodium vivax* (*pvama1*).

El gen que codifica para el antígeno de la membrana apical 1 de *P. vivax* (PvAMA-1) tiene un tamaño de 2,195 pb y se encuentra en el cromosoma 9. AMA-1 es una proteína integral de membrana tipo 1 que está presente en todas las especies de *Plasmodium*. Es sintetizada como una proteína de 83 KDa en el desarrollo tardío del ezquizonte de la fase eritrocítica de *P. vivax*, acumulándose en los meronemas del merozoíto en desarrollo. Está formada por diferentes regiones incluyendo un péptido señal, un dominio ectoplasmático o ectodominio (DEC), una región transmembranal y una pequeña región C-terminal que forma el dominio citoplasmático (DC) (Figura 7). El DEC cuenta con 16 residuos de cisteína que forman ocho puentes disulfuro que ayudan al plegamiento y su división en tres dominios: dominio I (DI), dominio II (DII) y dominio III (DIII) (Figura 7). En el DII se encuentra un motivo de unión perteneciente a la familia del plasminógeno-nemátodo (PAN) del cual sobresale un asa de 40 aminoácidos conservado. El ordenamiento de esta asa resulta en un hueco hidrofóbico que sirve como sitio de unión a ligando. Justo antes de la invasión del reticulocito, la forma madura de la proteína es transportada a la superficie de la membrana celular del merozoíto como una proteína de 66 kDa, jugando un papel fundamental en la reorientación del merozoíto y la subsiguiente formación de las uniones estrechas entre ambas células (Figura 6B) (Remarque *et al.*, 2008; Grynberg *et al.*, 2008 y Múfalo *et al.*, 2008).

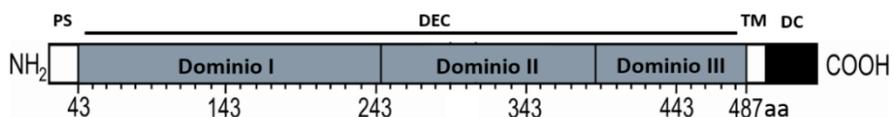


Figura 7. Diagrama esquemático del antígeno de la membrana apical 1 de *P. vivax* (PvAMA-1). Representación del péptido señal (PS) en la región amino terminal (NH₂), el ectodominio (DEC), la región transmembranal (TM) y el dominio citoplasmático (DC) en la región carboxil terminal (COOH). aa, aminoácidos. Tomado y modificado de Bueno *et al.*, (2011).

Los polimorfismos en el gen de *ama-1* de *P. vivax* (*pvama-1*) no ocurren al azar a lo largo de la región codificante, la mayoría de ellos son encontrados en el DEC, específicamente en DI. Se ha reportado que el DEC está bajo una selección natural balanceadora que permite mantener los polimorfismos en el DEC, y la principal presión de selección es el sistema inmune del hospedero. Estos resultados son apoyados por estudios que han demostrado que los polimorfismos en el DEC ayudan al parásito a la evasión de la respuesta inmune del hospedero (Grynberg *et al.*, 2008). Además, en personas infectadas con el parásito se ha detectado la generación de anticuerpos en contra del DEC de PvAMA-1 (Arévalo-Herrera *et al.*, 2010; Vicentin *et al.*, 2014).

2.7. Paludismo en México.

El reporte de casos de paludismo en los 1980's en México fluctuó entre 20,000 y 130,000. Pero, después de la implementación del Programa de Acciones Intensivas y Simultáneas (PAIS) (1989-1998) y el programa de Control Focalizado (2000-actualidad), México bajó considerablemente el número de casos y en 2007 paso a una fase de pre-eliminación (OMS, 2009). Desde el año 2000, *P. vivax* es el responsable del 100 % de los casos de paludismo autóctonos en los focos de transmisión persistentes: en el noroeste del país en los estados de Nayarit, Chihuahua, Sinaloa, Sonora y Durango, y en el sureste del país en el estado de Chiapas (frontera con Guatemala) (Figura 8A) (DGE, 2017).

2.7.1. Paludismo *vivax* en el sureste de Chiapas.

El estado de Chiapas ha sido un foco persistente difícil de eliminar y ha jugado un papel importante en la epidemiología del paludismo México. Durante la epidemia de 1985, el estado de Chiapas registró el 24.2 % (32,333) de los casos de paludismo, mientras que Oaxaca registro el 27 % (36,167), ambos estados contribuyeron con más del 50 % de los casos a nivel nacional. Posteriormente, durante el brote de 1998, 15,121 casos de paludismo fueron registrados a nivel nacional, Chiapas y Oaxaca registraron el 70 % y 21 % de los casos, respectivamente. Por otra parte, el devastamiento causado por el huracán STAN a finales del 2005 limitó el acceso a las zonas con paludismo en Chiapas provocando un aumento en el número de casos durante 2006-2007, principalmente en la región del Soconusco, registrando el 51 % (2818) de los casos a nivel nacional. Para 2016, Chiapas registro el 61.7 % (338) de los casos a nivel nacional, mientras que Oaxaca había quedado libre de paludismo desde 2013 (DGE, 2017).

El foco de transmisión de paludismo *vivax* en la frontera entre el estado de Chiapas y Guatemala (Figura 8B) se caracteriza por un patrón de transmisión persistente con riesgo permanente de brotes asociados a casos recurrentes, movimientos migratorios y movimiento continuo entre las comunidades fronterizas por el intercambio laboral y comercial. La transmisión en esta región es baja y estacional, una vez por año, generalmente dura de cuatro a seis meses; comenzando después de la temporada de lluvias y continua toda la temporada de secas (enero-junio). Es una región en donde la presencia de genotipos mezclados fue reportada baja (< 10 %) y poca probabilidad de que un paciente reciba más de un piquete en un año (Gonzalez-Ceron *et al.*, 2013). Los principales vectores de la transmisión en la región son *Anopheles pseudopunctipennis* predominante en zonas que se encuentran por arriba de los 180 msnm y *An. albimanus* en las costas (Gonzalez-Ceron *et al.*, 1999).

Para la detección de casos de paludismo en esta región se utiliza principalmente la detección pasiva de casos sintomáticos y la revisión de sus convivientes con un examen microscópico en sangre. La persistencia de las infecciones con *P. vivax* es favorecida por la presencia de recaídas, casos asintomáticos y casos clínicos no detectados ni tratados que mantienen la transmisión (Rodríguez *et al.*, 1993; Betanzos, 2011).

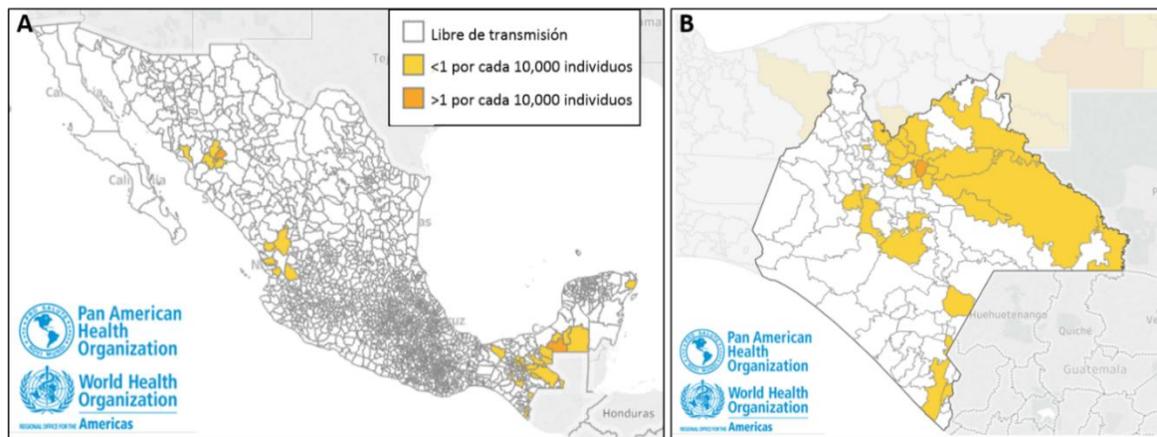


Figura 8. Límites de la transmisión de *Plasmodium vivax* en México. A. En México la transmisión del paludismo es focalizada en el noroeste y sureste del país. B. En el estado de Chiapas la transmisión se localiza en la región centro, noreste y sur del estado. Las zonas con transmisión en color amarillo y naranja fueron definidas por el PvPA previamente definido en la figura 2. Tomado y modificados de la Organización Panamericana para la Salud (OPS, 2017).

2.7.2. Genética poblacional de *Plasmodium vivax* en el sureste de Chiapas, México.

Los estudios moleculares de *P. vivax* en México iniciaron en la década de los 1990's en la región del sureste de Chiapas. Los primeros trabajos se enfocaron en la genotipificación de los parásitos analizando la proteína CSP y su relación con la infectividad a los mosquitos vectores. Infecciones experimentales mostraron una posible asociación de los genotipos de la proteína CSP de *P. vivax* a los vectores locales del sureste de México, *An. albimanus* fue más susceptible al genotipo VK210 que predomina en las costas, mientras que *An. pseudopunctipennis* fue más susceptible al genotipo VK247 y predomina en las faldas de las colinas (Kain *et al.*, 1992; Gonzalez-Ceron *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2000). Análisis posteriores con microsatélites identificaron tres subpoblaciones, una localizada en las costas (c1) transmitida principalmente por *An. albimanus*; y dos subpoblaciones (f1 y f2) localizadas en las colinas transmitidas principalmente por *An. pseudopunctipennis* (Joy *et al.* 2008). Resultados similares se reportaron con las proteínas Pvs25 y Pvs28, involucradas en la adhesión del oocineto al intestino del mosquito (Tomas *et al.*, 2001), en las cuales se identificaron dos genotipos principales Pvs 25/28 (A y B), el genotipo A transmitido por *An.*

albimanus en las costas y corresponde a la subpoblación c1, y el genotipo B que pueden encontrarse en ambos vectores con una mayor infectividad por *An. pseudopunctipennis* (González-Cerón *et al.*, 2010). La estructuración de las poblaciones sugiere un límite geográfico en la transmisión de las poblaciones del parásito y un aislamiento genético dado por la distribución del vector (Joy *et al.*, 2008; González-Cerón *et al.*, 2010).

Por otra parte, el marcador CSP en combinación con el marcador MSP3 (dominio alfa), y diversos microsatélites han permitido identificar episodios de recaídas en pacientes infectados con *P. vivax* en el sureste de Chiapas. La mayoría de las recaídas en esta región ocurren entre las semanas 27 a 52 después de haber identificado la infección primaria, las infecciones en su mayoría fueron homólogas, es decir que en la recaída presentó el mismo genotipo detectado en la infección primaria (Gonzalez-Ceron *et al.*, 2013). Este resultado es similar a los observados en otras zonas templadas (White, 2011 y Verhave, 2013).

Otros estudios con marcadores polimórficos han permitido determinar qué fuerzas evolutivas están moldeando a la población de *P. vivax* en la región. El uso de los bloques icb5-6 del gen *pvmsp-1* es reportado en otras regiones del mundo para el estudio de la diversidad genética (Putaporntip *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2003). Utilizando este marcador en el sureste de Chiapas se identificó la presencia de los tres tipos de secuencias: tipo Salvador-I (S), tipo Belem (B) y un híbrido (H) que comparte similitud con los tipos S y B, estas secuencias resolvieron 14 haplotipos distribuidos en dos grandes linajes (S/H, y B). Los haplotipos parecen ser producto de al menos tres procesos de recombinación de dos haplotipos ancestrales de Sudamérica y Asia que diversificaron rápidamente y han persistido debido a una selección natural positiva (Cerritos *et al.* 2014). Otros marcadores polimórficos candidatos para vacunas como *ama-1*, *msh-1* y *dbp* han presentado una diversidad genética baja-moderada, diversificación a nivel local y un alto grado de diferenciación respecto a otras regiones geográficas (González-Cerón *et al.* 2015). En el sureste de Chiapas, *msh-1₄₂* presentó mayor recombinación que *ama-1_{I-II}* y *dbp*, y se observó que las relaciones genealógicas son mucho más complejas usando el gen *msh-1₄₂* (González-Cerón *et al.*, 2015). Además, los genes *ama-1_{I-II}* y *msh-1₄₂* al igual que el icb5-6 presentan gran número de haplotipos exclusivos de la región (Cerritos *et al.*, 2014; González-Cerón *et al.* 2015).

Análisis genómicos para estudiar la diversidad genética, divergencia y estructura poblacional de *P. vivax* en esta región son limitados. Un estudio realizado a nivel global (incluyó 20 muestras del sureste de Chiapas) permitió determinar que los parásitos de México forman un grupo altamente diferenciado respecto a otras regiones de América (Colombia, Perú y Brasil),

sugiriendo que las poblaciones tienen un ancestro común muy reciente. De todas las regiones analizadas, México presentó la diversidad genética más baja (Hupalo *et al.*, 2016).

Finalmente, las mutaciones Y976F y F1076L en el gen de resistencia a multidrogas 1 (*mdr1*) que han sido asociadas a la resistencia a cloroquina en algunas regiones de Suramérica (Melo *et al.*, 2014; Hupalo *et al.*, 2016), no han sido detectadas en el sureste de Chiapas (Hupalo *et al.*, 2016; González-Cerón *et al.*, 2017). En general, la población de *P. vivax* del sureste de Chiapas presenta una diversidad genética limitada como resultado de procesos de diversificación recientes, y es altamente diferenciada y moderadamente estructurada.

2.8. Justificación.

La biología, epidemiología y patogénesis de *P. vivax* comienza a ser dilucidada gracias a los estudios genéticos y genómicos que se han desarrollado hasta nuestros días. Se tiene evidencia de que las poblaciones de este parásito son genéticamente diversas. Análisis temporales de genética de poblaciones son de gran utilidad para describir los cambios de la diversidad genética, estructura poblacional y demografía histórica de las poblaciones a nivel global y regional. Esta información puede ser de gran ayuda para poder describir las dinámicas de transmisión y consigo mejorar los programas de vigilancia epidemiológica molecular y los programas de control a nivel local y regional.

3. Objetivos.

3.1. Objetivo general.

Analizar la diversidad genética, estructura poblacional y demografía histórica de *P. vivax* durante 19 años (1993-2011) de transmisión en el sureste de México.

3.2. Objetivos particulares.

- a. Investigar, mediante dos genes de fase sanguínea, los cambios en la diversidad genética de *P. vivax* durante 1993-2011.
- b. Comparar la diversidad genética y estructura poblacional de *P. vivax* del sureste de México respecto a otras regiones geográficas con transmisión de paludismo.
- c. Analizar la demografía histórica de *P. vivax* durante 1993-2011.

4. Capítulo 1.

La selección natural balanceadora ha mantenido la diversidad genética de *Plasmodium vivax* en una región de baja transmisión del sureste de México, 1993-2011.

Resumen.

Desde el año 2000 *Plasmodium vivax* ha sido el responsable del 100 % de los casos de paludismo autóctonos en México, el foco de transmisión en la frontera entre el estado de Chiapas, México y Guatemala concentra el 70 % de los casos a nivel nacional. No obstante, en la última década el número de casos de paludismo en ese foco de transmisión ha disminuido drásticamente. La identificación de los procesos biológicos, evolutivos, ambientales e incluso sociales que puedan impactar la diversidad genética de *P. vivax* es de gran importancia para comprender los cambios en sus frecuencias alélicas, a su vez, este conocimiento permitirá mejorar los programas de vigilancia epidemiológica molecular. En el presente estudio analizamos los cambios temporales (1993-2001) de la diversidad genética, recombinación y selección natural de *P. vivax* en el sureste de México, basándonos en dos genes que codifican para proteína candidatas para vacunas: el fragmento de 42kDa de la proteína de superficie del merozoíto 1 (*pvmsp1₄₂*) y el dominio I y II del antígeno de la membrana apical 1 (*pvama1_{I-II}*). Además, hicimos la comparación con lo que ocurre en otras regiones geográficas afectadas.

En *pvmsp1₄₂* y *pvama1_{I-II}* se detectaron 17 y 14 haplotipos, respectivamente, y la combinación de ambos marcadores definió 38 haplotipos. En cada marcador se detectaron varios haplotipos frecuentes que mantuvieron la diversidad genética en el tiempo, pero el número de infecciones con más de un genotipo (IGMs) y la recombinación presentaron un decremento que coincide con la disminución en el número de casos registrados. En *pvmsp1₄₂* se detectaron cuatro haplogrupos separados por más de 17 pasos mutacionales, en cada haplogrupo se observó diversificación. Mientras que en *pvama1_{I-II}* la acumulación de pasos mutacionales dio como resultado dos haplotipos altamente divergentes. Además, los valores positivos de las pruebas de selección natural (*dN-dS* y McDonald-Kreitman) indican que ambos marcadores están bajo selección natural balanceadora. Respecto a otras regiones geográficas, los dos genes presentaron diversidad genética moderada, siendo *pvmsp1₄₂* > *pvama1_{I-II}*.

Nuestros resultados en conjunto sugieren que la diversidad genética de la población de *P. vivax* en el sureste de México durante 1993-2011 se ha mantenido por la presencia de haplotipos frecuentes mantenidos por selección natural balanceadora. Esos resultados tienen una gran significancia en el entendimiento de la dinámica de transmisión de *P. vivax* en el sureste de México, además es información valiosa para el desarrollo de estrategias de vigilancia epidemiológica molecular y diseño de vacunas.

Palabras clave: Paludismo, *Plasmodium vivax*, sureste de México, proteína de superficie del merozoíto, *pvmsp1₄₂*, antígeno de la membrana apical, *pvama1_{I-II}*, diversidad genética, selección balanceadora.

Introducción.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta al año 16 millones de casos de paludismo causados por *Plasmodium vivax*. En Latinoamérica, el número de casos ha disminuido de 678,000 en 2010 a 562,800 en 2016, representando un decremento del 17 % (OMS, 2017). En México, durante los años 1980's el reporte de casos de paludismo fluctuó entre 20,000 y 130,000. Pero, después de la implementación del Programa de Acciones Intensivas y Simultáneas (PAIS) (1989-1998) y el programa de Control Focalizado (2000-actualidad), México bajó considerablemente el número de casos y en 2007 paso a una fase de pre-eliminación, para el año 2017 solo se registraron 715 casos. Desde el año 2000, *P. vivax* es el responsable del 100% de los casos de paludismo autóctonos en México. El foco de transmisión en la frontera entre el estado de Chiapas, México y Guatemala concentra el 70 % de los casos a nivel nacional (DGE, 2017).

El estudio de la diversidad genética de las poblaciones de *P. vivax* a una escala regional y global, es de gran utilidad para describir su dinámica de transmisión y el diseño de vacunas, además de aportar información para la vigilancia epidemiológica molecular (Arnott *et al.*, 2012; Barry *et al.*, 2015; Daniels *et al.* 2015). Genes que codifican proteínas antigénicas de fase sanguínea involucradas en la evasión del sistema inmune son altamente polimórficas, permitiendo la detección de mayor diversidad nucleotídica y de haplotipos entre parásitos (Barry *et al.*, 2015). Además, al estar expuestos al sistema inmune del hospedero, pueden servir como potenciales candidatos para el desarrollo de vacunas (Cowman *et al.*, 2012). Dos candidatos prometedores en *P. vivax* son la proteína de la superficie del merozoíto 1 (PvMSP-1) y el antígeno de la membrana apical 1 (PvAMA-1), ambos antígenos participan en el proceso de invasión de los reticulocitos. La proteína MSP-1 participa en la adhesión inicial del merozoíto al reticulocito y la proteína AMA-1 en la reorientación de la parte apical del merozoíto y en la formación de las uniones estrechas que permiten al merozoíto iniciar la invasión del reticulocito (Wright y Rayner, 2014).

El alto grado de polimorfismo en ambos genes (*msp1* > *ama1*) es asociado con la evasión del sistema inmune del hospedero, se ha reportado que el fragmento de 33 kDa de PvMSP-1 está bajo selección natural balanceadora en parásitos de diferentes regiones geográficas como India (Thakur *et al.*, 2008), Turquía (Zeyrek *et al.*, 2010), Corea (Kang *et al.*, 2012), Camboya (Parobek *et al.*, 2014) y China (Zhou *et al.*, 2017). El ectodominio de PvAMA-1 también se ha reportado bajo selección balanceadora en Sri Lanka (Gunasekera *et al.*; 2007), Venezuela (Ord *et al.*, 2008) y Papúa Nueva Guinea (Arnott *et al.*, 2013).

El estudio de los cambios genéticos en el tiempo puede ayudar a identificar las fluctuaciones y relación genética de los haplotipos que han persistido en el sureste de México. En el presente trabajo, se analizaron el fragmento de 42kDa de la proteína de superficie del merozoíto 1

(*pvmosp1₄₂*) y el dominio I y II del antígeno de la membrana apical 1 (*pvama1_{I-II}*) de *P. vivax* con los objetivos de: 1) estudiar los cambios en la diversidad genética de *P. vivax* durante 19 años de transmisión en el sureste de México (1993-2011), y 2) comparar la diversidad genética de la población de *P. vivax* del sureste de México respecto a otras regiones endémicas.

Métodos.

Aislados de *Plasmodium vivax*.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Salud Pública de México (INSP) y se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes. Un total de 288 muestras fueron colectadas de pacientes sintomáticos durante los años 1993-2011 (Gonzalez-Ceron *et al.* 1998; Rodriguez *et al.* 2000; González-Cerón *et al.* 2013), de 105 pacientes se obtuvo y preservó paquete globular (sangre completa) y de 183 pacientes se obtuvieron unas gotas de sangre capilar impregnadas en papel filtro. De 1993-2000 y 2010-2011 solo se tenían muestras preservadas en papel filtro, de los años 2001-2009 sangre completa y algunas muestras de 2001, 2008 y 2009 en papel filtro. El diagnóstico para *P. vivax* fue realizado en el laboratorio del Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP-INSP). Los pacientes vivían en la Jurisdicción sanitaria VII del estado de Chiapas, México, la cual comprende un área específica de 4644.07 km² con un clima tropical y templado, y una altitud que va desde el nivel del mar hasta la región de las montañas a 4000 msnm.

Amplificación y secuenciación de los marcadores *pvmosp1₄₂* y *pvama1_{I-II}*.

La extracción de ADN se hizo utilizando el QIAamp[®] DNA Blood Mini kit (Quiagen, USA), siguiendo las instrucciones del productor. El fragmento de 42 KDa de MSP1 (*pvmosp1₄₂*) y el dominio I y II de AMA1 (*pvama1_{I-II}*) de *P. vivax* fueron amplificados por PCR usando un grupo de iniciadores específicos para cada marcador (Tabla 1).

Tabla 1. Iniciadores específicos utilizados para amplificar los marcadores *pvmosp1₄₂* y *pvama1_{I-II}*.

Marcador	Iniciador	Tipo de PCR	Secuencia	Referencia
<i>pvmosp1₄₂</i>	pvmosp1_F1	Primaria/Anidado	5' GCC GAG GAC TAC GAC AAA G 3'	González-Cerón <i>et al.</i> , 2015
	pvmosp1_R1	Primaria	5' CAA GCT TAG GAA GCT GGA GG 3'	González-Cerón <i>et al.</i> , 2015
	pvmosp1_R3	Anidado	5' CCC TCA AAG AGT GGC TCA GA 3'	Este trabajo
<i>pvama1_{I-II}</i>	pvama1F	Primaria/Anidado	5' TCC AGC TGG AAG ATG TCC TG 3'	González-Cerón <i>et al.</i> , 2015
	pvama1R	Primaria	5' CCG CCC TTT TCT CTA CAC AG 3'	González-Cerón <i>et al.</i> , 2015
	pvama1R2	Anidada	5' CGC AGG GAC ATT TGA TAC TCT CC 3'	Este trabajo

La reacción de PCR para la amplificación de *pvmosp1₄₂* consistió en una mezcla de 1X Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega, Madison, WI), 1 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, CA), 10 pM de cada iniciador (*pvmosp1_F1* y *pvmosp1_R1*), 1.25 U de enzima GoTaq® DNA Polimerasa (Promega, Madison, WI), 1.5-4 µl de ADN extraído de sangre completa o 2-4 µl de ADN extraído de muestras de papel filtro, y agua alcanzando un volumen final de 50 µl. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineación a 60°C por 1 min y extensión a 72°C por 75 seg; y una extensión final a 72°C por 10 min.

Las muestras amplificadas se procesaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% y el producto amplificado se visualizó con 0.2 µg/ml de bromuro de etidio bajo luz ultravioleta. Las muestras amplificadas con presencia de una banda única se purificaron y concentraron con el MinElute® PCR Purification Kit (Quiagen, USA), siguiendo las instrucciones del productor. Los productos de PCR purificados fueron secuenciados en MacroGen, Inc. (Geumcheon-qu, Seul, Rep. Korea).

De las muestras que no se alcanzó una concentración de 30 ng/µl de ADN o no hubo producto de PCR visible, se amplificaron nuevamente por PCR anidado utilizando los iniciadores (*pvmosp1_F1* y *pvmosp1_R3*) bajo las condiciones ya mencionadas, usando 1-2 µl de producto de PCR de la primera reacción.

Para la amplificación del marcador *pvama1_{I-II}* la reacción de PCR consistió en una mezcla de 1X High Fidelity Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, CA), 36 pM de cada iniciador (*pvama1_F1* y *pvama1_R1*), 1 U de enzima Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1-4 µl de ADN extraído de sangre completa o 2-6 µl de ADN extraído de muestras de papel filtro, y agua alcanzando un volumen final de 50 µl. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, alineación a 61°C por 1 min y extensión a 72°C por 75 seg; y una extensión final a 72°C por 10 min.

Las muestras amplificadas se procesaron por electroforesis, y se purificaron y se concentraron como ya se describió para *pvmosp1₄₂*. Los productos de PCR purificados fueron secuenciados en el Centro de Alto Rendimiento en Genómica (Seattle, WA, USA).

De las muestras que no se alcanzó una concentración de 30 ng/µl de ADN o no hubo producto de PCR visible, se amplificaron nuevamente por PCR anidado utilizando los iniciadores (*pvama1_F1* y *pvama1_R2*) bajo las condiciones ya mencionadas, usando 1-2 µl de producto de PCR de la primera reacción.

Todas las reacciones de PCR para ambos marcadores se realizaron en un termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems®, CA, USA).

En 24 electroferogramas de *pvama1_{I-II}* se observaron dobles picos en diferentes posiciones, indicando infecciones con más de un haplotipo, entonces el producto de PCR de la primera amplificación se utilizó para hacer clonación bacteriana utilizando el TOPO TA clonig® kit with pCR®2.1-TOPO® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). De 3-5 diferentes colonias de bacterias de cada aislado se mandaron a secuenciar al Centro de Alto Rendimiento en Genómica (Seattle, WA, USA).

Las secuencias de nucleótidos obtenidas se revisaron utilizando el programa *BioEdit Sequencing Alignment Editor* v5.0.9 (Hall, 1999) y alinearon con *Clustal W* (Thompson *et al.* 1994) utilizando como referencia la secuencia homóloga de Salvador I (*Sal-I*) (GenBank: XM_001614792 para *pvmsp1₄₂* y AY598140 para *pvama1_{I-II}*).

El número de muestras analizadas por PCR y secuencias obtenidas por marcador por año se presentan en la Tabla 2. No todas las muestras amplificaron o se obtuvo suficiente ADN para obtener la secuencia del fragmento amplificado, principalmente muestras de sangre preservadas en papel filtro de los años 1993-2000.

Tabla 2. Número total de muestras por marcador por año analizadas por PCR y número de secuencias obtenidas y analizadas.

Año	# muestras	<i>pvmsp1₄₂</i>		<i>pvama1_{I-II}</i>	
		Analizadas por PCR	Secuencias obtenidas	Analizadas por PCR	Secuencias obtenidas
1993	12	10	5	12	6
1994	25	16	6	25	11
1995	8	8	3	8	8
1996	4	4	2	4	0
1997	18	10	3	18	8
1998	18	9	2	18	7
1999	21	12	5	21	11
2000	17	3	2	17	2
2001	11	7	3	11	4
2002	19	18	18	19	18
2003	22	20	20	22	17
2004	20	20	19	20	18
2005	21	20	19	21	19
2006	0	0	17*	0	17*
2007	0	0	18*	0	18*
2008	22	21	16	22	19
2009	20	20	16	20	17
2010	17	15	13	17	13
2011	13	12	11	13	12
Total	288	225	198	288	225

* Las secuencias de los años 2006-2007 para ambos marcadores fueron reportadas por González-Cerón *et al.*, 2015.

Análisis genéticos.

Los análisis del SMX se realizaron para el total de las secuencias obtenidas de *pvmsp1₄₂* y *pvama1_{I-II}*, y por periodos. Además, para los análisis globales se incluyeron secuencias homologas a *pvmsp1₄₂* y *pvama1_{I-II}* de diferentes regiones geográficas disponibles en el NCBI (Anexo 1 y 2, respectivamente).

El programa *DnaSP* v5.1 (Librado y Rosaz, 2009) fue utilizado para determinar el número de polimorfismos (*S*), número de haplotipos (*h*), diversidad haplotípica (*Hd*), diversidad nucleotídica (π), desequilibrio de ligamiento (LD) dado por el índice R^2 , número de eventos mínimos de recombinación (*Rm*) e identificar el número de polimorfismos sinónimos (*dS*) y no sinónimos (*dN*). Además, para determinar si la diversidad observada se alejaba de la neutralidad, la diferencia entre el número de sustituciones de nucleótidos no sinónimos (*dN*) por sinónimos (*dS*) (*dN-dS*) fue evaluada con el programa *MEGA* v6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Dicha estimación fue hecha usando la reconstrucción de máxima verosimilitud conjunta de estados ancestrales bajo los modelos de Muse-Gaut (Muse & Gaut 1994) y de sustitución de codones de Felsenstein (Felsenstein, 1981). Como una segunda prueba de neutralidad, se aplicó la prueba de McDonald and Kreitman (McDonald & Kreitman, 1991) usando el programa *DnaSP* v5.1. Para esto se utilizó la secuencia de *Plasmodium cynomolgi* como grupo externo (GenBank: AY869723 para *pvmsp1₄₂* y X66099 para *pvama1_{I-II}*).

Finalmente, para investigar la relación genética entre los haplotipos de *pvmsp1₄₂* y *pvama1_{I-II}* del SMX, y sus cambios a través del tiempo se construyeron siete redes de haplotipos para cada marcador en el programa *PopArt* v1.7 (Leigh y Bryant, 2015). La primera red se construyó con el total de las secuencias, esta red se utilizó como templado para adecuar las seis redes de haplotipos, una para cada periodo de tiempo. Posteriormente se apilaron de forma gradual para dar un efecto tridimensional-temporal. Las redes muestran la relación entre genotipos conectados a través de pasos mutacionales y permite asignar a los haplotipos existentes con un ancestro común de la población y dentro de un patrón (Templeton y Sing, 1993).

Análisis filogenéticos.

Para obtener el modelo evolutivo de *pvmsp1₄₂* y *pvama1_{I-II}*, las secuencias de cada marcador fueron analizadas en el programa *jModeltest* 2 (Darriba *et al.*, 2012). Evaluamos 40 modelos de sustitución que asumen frecuencias de bases iguales y desiguales (+F), proporción de sitios invariables (+I) y cuatro categorías de variación entre sitios (+G). La topología óptima se estimó con el algoritmo de máxima verosimilitud (ML). Para ambos marcadores el valor más alto del criterio de Akaike fue para el modelo de sustitución gamma con sitios invariables GTR + I + G. Estos modelos se utilizaron en los análisis filogenéticos.

Para determinar la relación global entre haplotipos de cada marcador, se hizo un análisis con el programa *splitstree* v4.14.6 (Hudson y Bryant, 2006). Este programa permite hacer un análisis basándose tanto en redes de haplotipos como árboles filogenéticos, además permite hacer inferencias filogenéticas. Para ambos marcadores utilizamos el método neighbour-net bajo el modelo evolutivo GTR.

Un árbol filogenético fue inferido para cada marcador con el programa *Mr. Bayes* v3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012). Para cada marcador, cinco Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) se corrieron por 20 millones de generaciones, muestreando los árboles cada 200 generaciones. El árbol consenso y sus probabilidades posteriores se obtuvieron después de descartar el 20 % inicial de árboles acumulados. Como grupo externo se utilizaron secuencias homólogas de *P. cynomolgi* (GenBank: AY869723 *pvmsp1₄₂*; X66099 *pvama1_{1-II}*).

Resultados.

Genotipificación de *pvmsp1₄₂* en aislados de *P. vivax* del sureste de México.

A partir de 225 muestras de sangre infectada con *P. vivax* se obtuvieron 163 secuencias con un solo alelo por muestra (72.4 %), el tamaño de la secuencia fue de 936 pb y contiene los nucleótidos 4093-5028 correspondientes al fragmento de 42 KDa (*pvmsp1₄₂*). En 25 muestras (11.1 %) los electroferogramas mostraron dobles picos en más de una posición, sugiriendo más de un alelo por muestra (infecciones con más de un genotipo, IGMs). El 30.4 % (n = 24) de las muestras analizadas para *pvmsp1₄₂* durante los años 1993-2001 resultaron ser IGMs, una IGM fue detectada en el año 2009, representando el 5 % de las muestras para ese año (Figura 1).

Para los análisis se incluyeron 35 secuencias correspondientes a los años 2006 y 2007 (González-Cerón *et al.*, 2015) para un total de 198 secuencias. El número total de secuencias por locus por año analizadas se presentan en la Tabla 2. El alineamiento entre las 198 secuencias reveló un total de 57 polimorfismos. Cincuenta y uno de los polimorfismos fueron dimórficos, cinco trimórficos y uno tetramórfico, todos los polimorfismos se localizaron en el fragmento *pvmsp1₃₃* (Tabla 3).

Los 57 polimorfismos resolvieron 17 haplotipos (h1-h17), los haplotipos más abundantes fueron h1, h4, h5 y h9, con frecuencias de 31.81 %, 21.2 %, 14.64 % y 18.68 %, respectivamente. Se observó una alternancia temporal entre los cuatro haplotipos más frecuentes, por ejemplo, los haplotipos h1, h5 y h9 bajaron sus frecuencias en el periodo 2006-2007, justo después del huracán Stan (2005), por el contrario, el haplotipo h4 aumentó su frecuencia en el mismo periodo. Otros tres haplotipos (h2, h10 y h12) presentaron persistencia en frecuencias bajas (Figura 1).

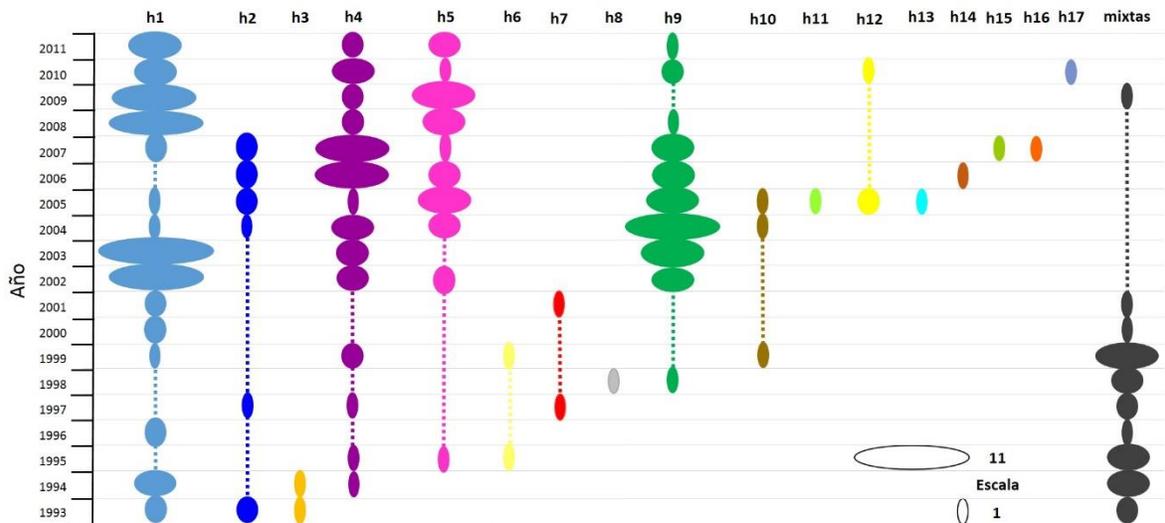


Figura 1. Distribución anual de los haplotipos de *pvmsp1₄₂* en el sureste de México de 1993-2011. A partir de 198 secuencias de ADN para *pvmsp1₄₂* se encontraron un total de 17 haplotipos (h1-h17). Cada haplotipo está indicado en un color diferente. En negro se muestran las infecciones con más de un genotipo (IGMs). El número de muestras en los años 1993-2001 fue bajo, esto pudo afectar la detección algunos haplotipos en ciertos años.

Genotipificación de *pvama1_{I-II}* en aislados de *P. vivax* del sureste de México.

A partir de 288 muestras de sangre infectada con *P. vivax* se obtuvieron 188 secuencias con un solo alelo por muestra (65.3 %). Los electroferogramas de 25 muestras (8.7 %) resultaron ser IGMs, veintidós de ellas se encontraron entre los años 1993-2000, representando el 16.4 % (n = 22) de las muestras analizadas en ese periodo, mientras que en los años 2003 y 2010 se detectaron dos y una IGM, respectivamente, representando el 9.1 % y el 5.9 % de las muestras analizadas por cada año. De 14 de las IGMs, por clonación se obtuvo un alelo por muestra y de 2 muestras, de los años 1998 y 2000, se resolvieron 2 alelos por cada muestra. Además, para los análisis se incluyeron 35 secuencias correspondientes a los años 2006 y 2007 (González-Cerón *et al.*, 2015) para un total de 225 secuencias. El número total de secuencias analizadas por año se presentan en la Tabla 2.

Se obtuvo un fragmento de 702 pb, del nucleótido 454 al 1,155 respecto a la secuencia de *Sal-I*, y corresponden a un segmento del dominio I y el dominio II completo (*pvama1_{I-II}*). El alineamiento múltiple entre las 225 secuencias reveló un total de 16 sitios polimórficos. Todos los polimorfismos fueron dimórficos, 10 se localizaron en el dominio I y 6 en el dominio II (Tabla 4).

Tabla 4. Polimorfismos y haplotipos definidos por *pvama1_{I-II}* en parásitos del sureste de México. La secuencia de *Sal-I* fue utilizada como referencia (AY598140). Los polimorfismos son indicados por los cambios.

	n	Dominio I (454-747)										Dominio II (748-1,155)					
		565	567	568	577	583	628	680	682	683	684	829	911	1056	1103	1138	1151
<i>Sal I</i>		G	A	A	C	T	C	A	A	G	C	G	A	G	A	C	T
H 1	95	A	T	A	.	T	.	.	.
H 2	11	A	.	.	T	.	C
H 3	1	A	C
H 4	18	A	.	C	.	.	.	T	G	A	T	A	.	.	.	A	C
H 5	32	A	.	C	A	.	T	.	.	.
H 6	2	A
H 7	2	A	A	.	T	.	.	.
H 8	53	T	G	A	T	A	.	.	T	.	C
H 9	1	.	.	.	T	.	T	A	.	.	.	A	C
H 10	5	A	.	C	.	.	.	T	G	A	T	A
H 11	1	T	G	A	T	A	C
H 12	1
H 13	1	A	.	C	A	C
H 14	1	A	.	T	.	.	.
H 15	1	A	.	T	G	A	T	A	G	.	T	.	C

Los 16 polimorfismos resolvieron quince haplotipos (H1-H15), los haplotipos más abundantes fueron H1, H5 y H8, con frecuencias de 42.22 %, 14.22 %, y 23.55 %, respectivamente. H1 fue el único haplotipo que persistió durante 1993-2011, mientras que H8 fue persistente durante 1998-2011. Otros haplotipos (H2, H4 y H10) presentaron persistencia en frecuencias bajas (Figura 2).

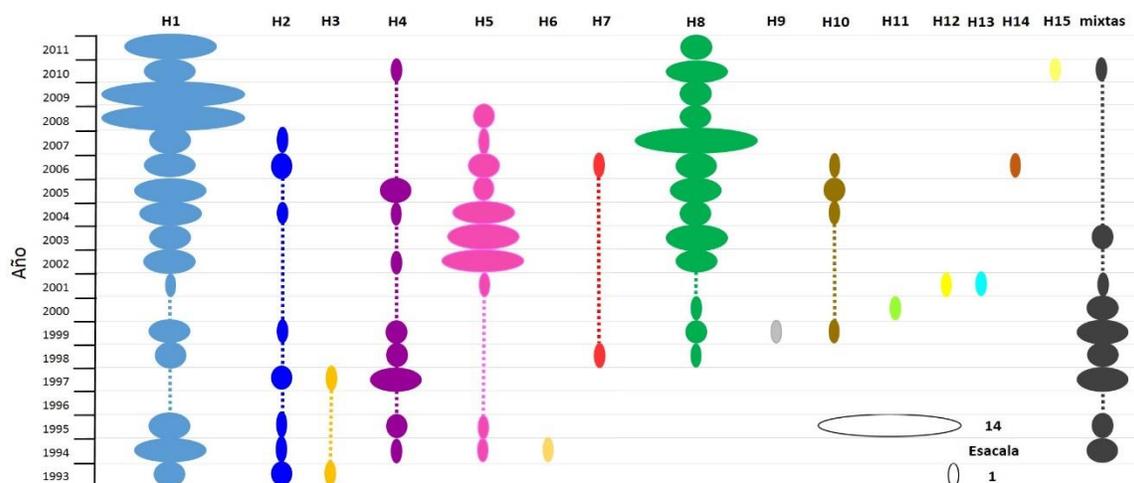


Figura 2. Distribución anual de los haplotipos de *pvama1_{I-II}* en el sureste de México de 1993-2011. A partir de 225 secuencias de ADN para *pvama1_{I-II}* se encontraron un total de 15 haplotipos (H1-H17). Cada haplotipo está indicado en un color diferente. En negro se muestran las infecciones con más de un genotipo (IGMs).

Análisis temporales en el sureste de México.

Para los análisis temporales del sureste de México las secuencias de los dos genes fueron agrupadas en 6 periodos consecutivos: *pvmsp142*: 1993-2001 (n = 31), 2002-2003 (n = 38), 2004-2005 (n = 38), 2006-2007 (n = 35), 2008-2009 (n = 33) y 2010-2011 (n = 24), y *pvama1_{I-II}*: 1993-2001 (n = 57), 2002-2003 (n = 35), 2004-2005 (n = 37), 2006-2007 (n = 35), 2008-2009 (n = 36) y 2010-2011 (n = 25). El criterio para formar los periodos fue que cada uno contuviera por lo menos 20 secuencias, En el periodo 1993-2001 el número de secuencias obtenidas fue bajo, ya que fue el periodo donde se detectaron la mayoría de las IGMs y aunque se obtuvieron electroferogramas no se pudo diferenciar entre los posibles genotipos, además, las muestras de sangre estaban conservadas en papel filtro, lo que complicó extraer ADN de buena calidad. Debido a lo anterior, los periodos se definieron tratando de obtener un tamaño de muestra similar entre periodos.

Diversidad genética, selección natural y recombinación.

El marcador *pvmsp142* fue más diverso ($\pi = 0.0219$, $Hd = 0.802$) que *pvama1_{I-II}* ($\pi = 0.0067$, $Hd = 0.740$) (Tabla 5). La diversidad nucleotídica que presentaron ambos genes no presentó cambios evidentes en el tiempo (*pvmsp142*: $\pi = 0.0196$ - 0.0217 , *pvama1_{I-II}*: $\pi = 0.0069$ - 0.0070) (Figura 3a).

Tabla 5. Parámetros de diversidad genética y recombinación en *pvmsp142* y *pvama1_{I-II}* del sureste de México.

Marcador	<i>pb</i>	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>H</i>	<i>Hd (DE)</i>	π (DE)	<i>DL (R²)</i>	<i>Rm</i>
<i>pvmsp-142</i>	936	198	57	17	0.802 ± (0.014)	0.0219 ± (0.0005)	0.3324	12
<i>pvama-1_{I-II}</i>	702	225	16	15	0.740 ± (0.020)	0.0067 ± (0.0002)	0.5032	2

pb, pares de bases; *N*, número de muestras; *S*, sitios segregativos; *H*, número de haplotipos; *Hd*, diversidad haplotídica; π , diversidad nucleotídica; *DL*, desequilibrio de ligamiento; *Rm*, eventos mínimos de recombinación.

Los valores de *dN-dS* fueron positivos para ambos marcadores, *pvmsp142* presentó valores de 0.675 en 1993-2001 y aumentaron gradualmente a 1.420 en 2006-2007, posteriormente bajaron de manera gradual hasta 1.105 en 2010-2011. Por otra parte, los valores para *pvama1_{I-II}* presentaron una tendencia a disminuir en el tiempo con valores de 1.700 en el periodo 1993-2001 y 1.320 en 2010-2011, el valor más bajo se presentó en el periodo 2006-2007 (1.273) (Figura 3b). El marcador *pvmsp142* presentó mayor número de sustituciones no sinónimas que *pvama1_{I-II}*. Los valores de *dN-dS* en *pvmsp142* y *pvama1_{I-II}* para el periodo

1993-2011 fueron positivos, pero no significativos ($P > 0.05$), sin embargo, la prueba de McDonald-Kreitman fue positiva y significativa ($P < 0.001$) para ambos marcadores (Tabla 6).

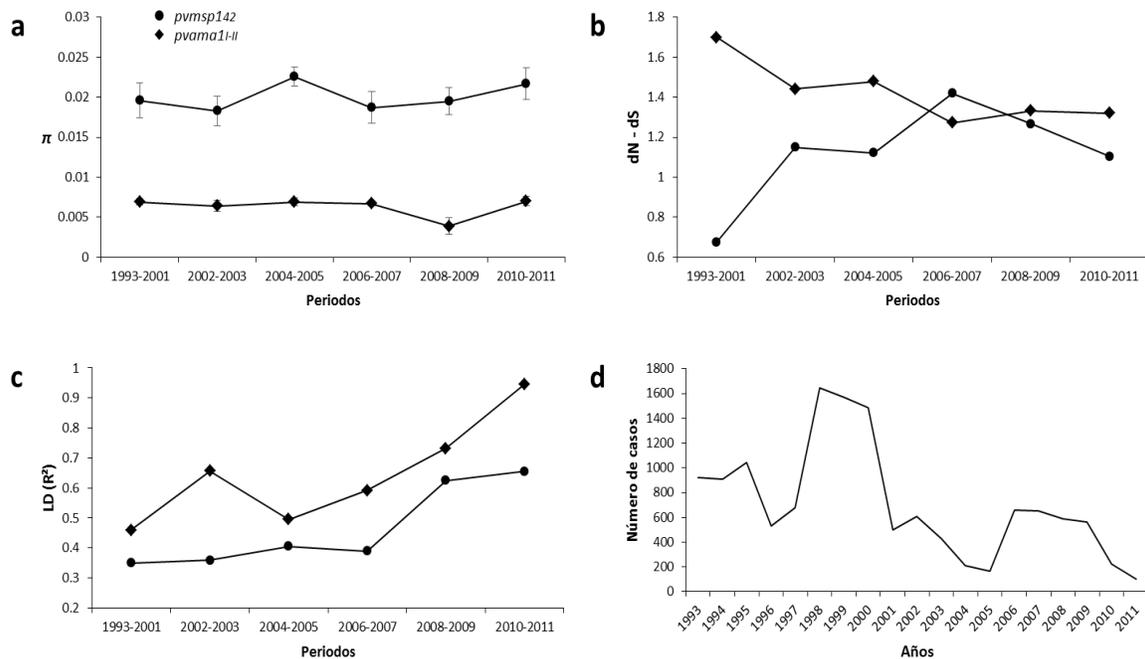


Figura 3. Cambios genéticos de *pvmsp142* y *pvama-1-I-II* en el sureste de México durante 1993-2011. a. diversidad nucleotídica (π). b. Selección natural (valores de $dN-dS$). c. Desequilibrio de ligamiento dado por R^2 . d. Incidencia anual de los casos clínicos confirmados durante el periodo 1993-2013 en la jurisdicción VII del estado de Chiapas.

Tabla 6. Pruebas de selección natural en *pvmsp142* y *pvama1-I-II* del sureste de México.

Marcador	Cambios dentro de las poblaciones de <i>P. vivax</i>		$dN - dS$	p	Cambios fijados entre especies*		McDonald-Kreitman (IF)	Prueba de Fisher (p)
	Sinónimas	No sinónimas			Sinónimas	No sinónimas		
<i>pvmsp-142</i>	7	38	1.084	0.14	55	69	4.327	0.00032
<i>pvama-1-I-II</i>	1	14	1.544	0.06	52	23	31.652	0.00001

$dN-dS$, diferencias entre sustituciones no sinónimas y sinónimas. **Plasmodium cynomolgi* fue usado como grupo externo para ambos marcadores (GenBank: *pvmsp142* AY869723.1 y *pvama-1-I-II* X66099.1). IF, índice de fijación.

Se encontraron 12 eventos mínimos de recombinación (Rm) en el total de las secuencias de *pvmsp142* y solo dos en *pvama1-I-II*, y los valores de desequilibrio de ligamiento (DL) fueron de 0.3324 y 0.5032, respectivamente (Tabla 5). Los niveles de DL en *pvmsp142* mostraron valores más bajos que en *pvama1-I-II*, pero en ambos marcadores se presentó una tendencia de los

valores de DL a aumentar con la disminución en el número de casos, siendo más notorio en *pvama1_{I-II}*. Los valores de DL en *pvmsp1₄₂* fueron de 0.3500 en el periodo 1993-2001 y 0.6555 en el periodo 2010-2011. Mientras que en *pvama1_{I-II}* los valores fueron de 0.4590 en el periodo 1993-2001 a 0.9462 en el periodo 2010-2011 (Figura 3c).

En la Figura 3d se presentan el número de casos confirmados durante 1993-2011 registrados por la Jurisdicción Sanitaria VII del estado de Chiapas, México. Dos picos en el número de casos pueden ser observados, el primero durante 1998-2000 y el segundo durante 2006-2009.

Red de haplotipos para el marcador *pvmsp1₄₂*.

Diecisiete haplotipos fueron interconectados por uno a veinte pasos mutacionales. Cuatro haplogrupos fueron identificados (hg1-hg4), separado uno del otro por 22 a 52 pasos mutacionales. Los hgs presentaron diversificación, cada hg fue representado por uno de los cuatro haplotipos más frecuentes (h1, h4, h5 y h9) y varios haplotipos en frecuencias bajas o raros. Los haplogrupos con más haplotipos fueron hg2 y h4, con cinco haplotipos cada uno, mientras que hg1 fue conformado por cuatro haplotipos y hg3 por tres. Dentro de cada haplogrupo los haplotipos fueron interconectados por 1-9 pasos mutacionales. La red también reveló un bucle dentro del hg3, posiblemente producto de la recombinación entre los haplotipos h5, h7 y otros haplotipos no muestreados o extintos (Figura 4a).

La red temporal para *pvmsp1₄₂* nos permitió ubicar las relaciones genealógicas entre los haplotipos presentes en distintos periodos. Siete haplotipos fueron detectados en más de un periodo, el resto fueron haplotipos únicos; los cuatro haplotipos más frecuentes (h1, h4, h5 y h9) fueron detectados en los seis periodos (Figura 4b). Otros haplotipos menos frecuentes fueron detectados en más de un periodo, el haplotipo h2 que estuvo a dos pasos mutacionales de h4 fue detectado en los periodos 1993-2001, 2004-2005 y 2006-2007, el haplotipo h10 a dos pasos mutacionales de h9 fue detectado en los periodos 1993-2001 y 2004-2005, mientras que el h12 que estuvo a dos pasos mutacionales de h1 fue detectado en los periodos 2004-2005 y 2010-2011. El mayor número de haplotipos fue detectado durante los periodos 1993-2001 (n = 10) y 2004-2005 (n = 9) (Figura 4b).

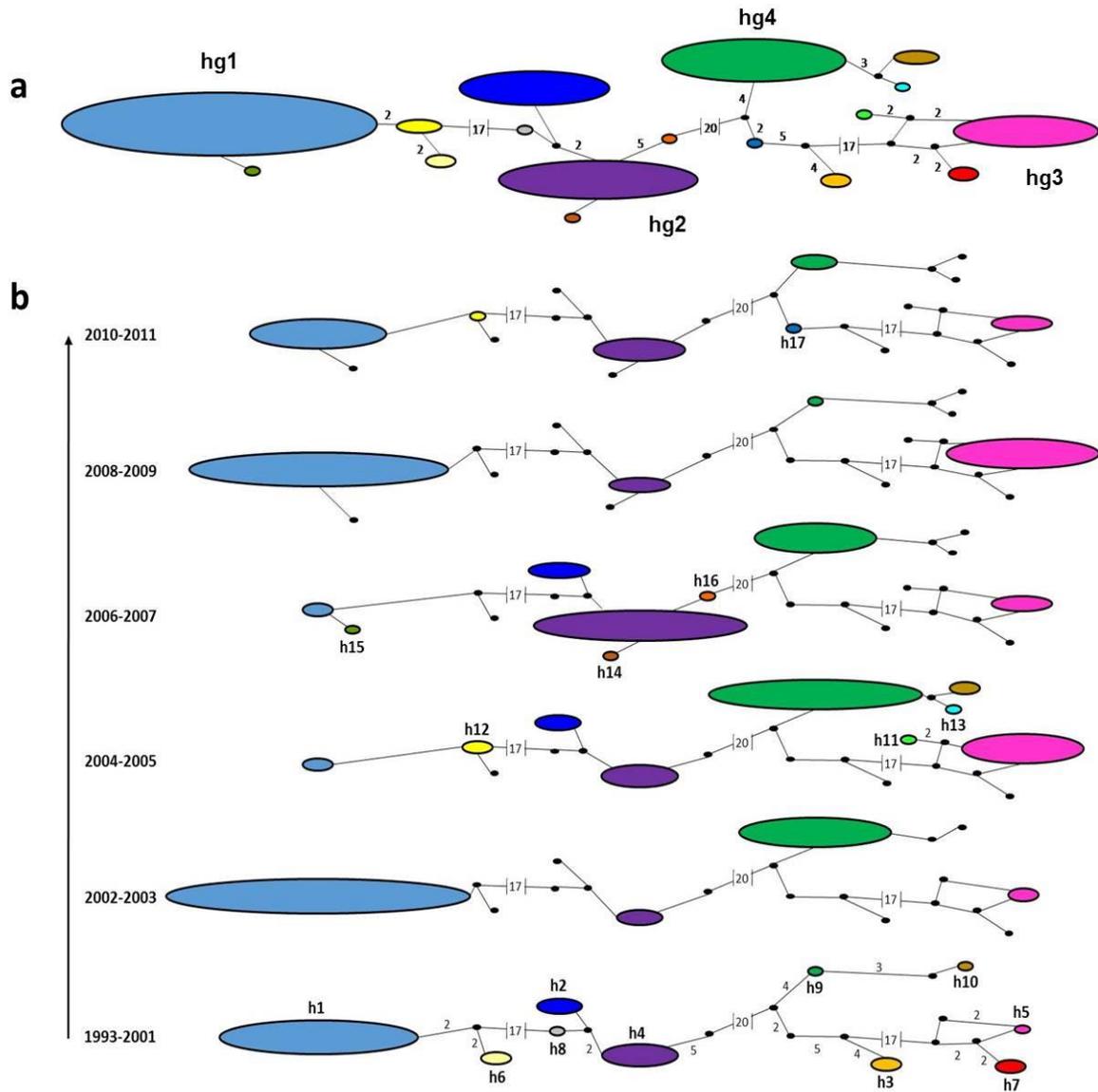


Figura 4. Red de haplotipos temporal de *pvmsp142* en el sureste de México. a. Red principal obtenida con el periodo (1993-2011). b. Red con estructura de seis correspondientes a cada uno de los seis periodos de tiempo; cada color corresponde a un haplotipo (h1-h17) y el tamaño del ovalo es proporcional al número de aislados que comparten el mismo haplotipo, excepto para h1, h4, h5 y h9 que se presentan a 0.33 % de su tamaño real. Los puntos negros representan haplotipos no muestreados o extintos; las líneas solidas conectan a los haplotipos; los números cerca de cada línea indican el número de pasos mutacionales entre haplotipos.

Red de haplotipos para el marcador *pvama1-I-II*.

La red mostró que los 15 haplotipos fueron interconectados por 1-11 pasos mutacionales, y haplotipos contiguos se separaron de 1-4 pasos mutacionales. Los haplotipos H1 y H8 fueron los más frecuentes (42.22 % y 23.55 %, respectivamente) y altamente divergentes, separados por nueve pasos mutacionales (Figura 5A). El tercer haplotipo mas frecuente, H5 (14.22 %),

se encontró a dos pasos mutacionales de H1 y a siete pasos de H8. La red también revela dos bucles, lo que sugiere eventos de recombinación entre los haplotipos H2, H3, H8 y H11, y entre los haplotipos H3, H5, H6, H7 y H14 (Figura 5A).

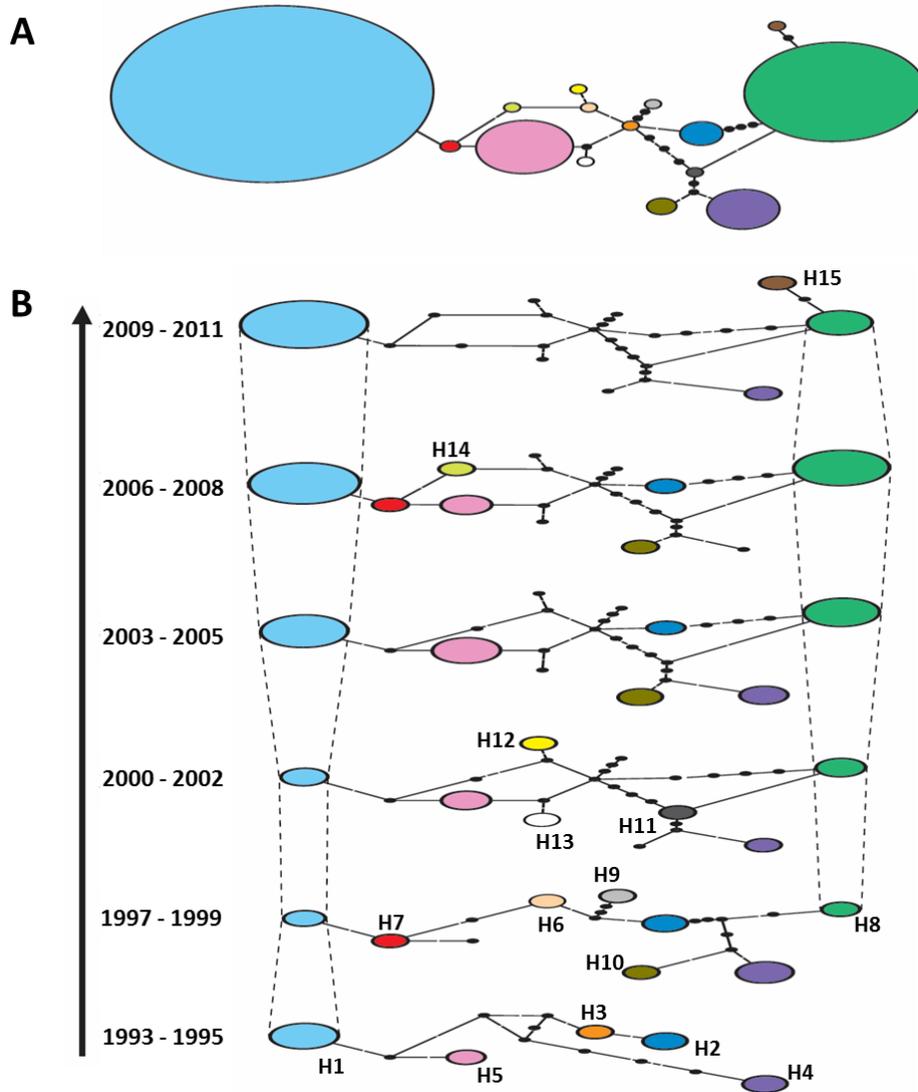


Figura 5. Red de haplotipos temporal de *pvama1-II* en el sureste de México. A. Red principal obtenida con el periodo (1993-2011). B. Red con estructura de seis correspondientes a cada uno de los seis periodos de tiempo; cada color corresponde a un haplotipo (H1-H15) y el tamaño del ovalo es proporcional al número de aislados que comparten el mismo haplotipo, excepto para h1 y h8 que se presentan a 0.5 % de su tamaño real. Los puntos negros representan haplotipos no muestreados o extintos; las líneas solidas conectan a los haplotipos; los números cerca de cada línea indican el número de pasos mutacionales entre haplotipos.

Siete de los 15 haplotipos fueron observados en más de un periodo de tiempo. El haplotipo que se presentó en todos los periodos de tiempo fue H1, por su parte H8 fue detectado desde

el periodo 1997-1999 al 2009-2011 (Figura 5B). Cinco haplotipos (H2, H4, H5, H7 y H10) fueron detectados en más de un periodo de tiempo, pero, presentando apariciones interrumpidas en el tiempo (presencia/ausencia); por ejemplo, H2 que estuvo a cuatro pasos mutacionales de H8 fue detectado por primera vez en el periodo 1993-1995 y se mantuvo hasta el periodo 1997-1999, luego en el periodo 2000-2002 no fue detectado, pero para el periodo 2003-2005 fue detectado nuevamente y se mantuvo hasta el periodo 2006-2008 (Figura 5B). Este tipo de eventos ocurrió hasta 5 veces para un mismo haplotipo con diferentes intervalos de tiempo entre detecciones (Figura 5B). El resto de los haplotipos detectados en un solo se detectaron en un periodo de tiempo dado (Figura 5b). El mayor número de haplotipos fue detectado durante los periodos 1997-1999 ($n = 8$).

Haplotipos definidos por la combinación de *pvmosp1₄₂* y *pvama1_{I-II}*.

En 177 muestras se obtuvieron secuencias para ambos genes (*pvmosp1₄₂* - *pvama1_{I-II}*). La combinación de ambos genes resolvió 38 haplotipos. Los haplotipos más frecuentes fueron: A (19.2 %), D (13.0 %), AC (11.8 %), AA (9.6 %), R (8.5 %), C (7.9 %) y W (5.1 %), representando el 75.1 % de las muestras. Estos haplotipos frecuentes presentaron a los haplotipos frecuentes por marcador: *pvmosp1₄₂* (h1, h4, h5 y h9) y de *pvama1_{I-II}* (H1, H5 y H8) (Figura 6).

La presencia de los haplotipos frecuentes varió en el tiempo, el haplotipo D fue el único detectado en los seis periodos, el resto de los haplotipos se detectaron en 2-5 periodos, además, se detectaron fluctuaciones en sus frecuencias. A pesar del bajo número de muestras en el periodo 1993-2001 se detectaron 12 haplotipos, seis de ellos exclusivos, además se detectaron cuatro de los haplotipos frecuentes (A, D, R y C), entre ellos el haplotipo A fue el más frecuente. En el periodo 2002-2001 el haplotipo A bajo su frecuencia y el haplotipo R aumento drásticamente su frecuencia, mientras que el haplotipo C la mantuvo, además de que se detectaron los haplotipos AA, W y AC, este último en frecuencia alta. Para el periodo 2004-2005 los haplotipos A y C bajaron su frecuencia, mientras que los haplotipos D y W las aumentaron, el haplotipo AC no presentó cambios. El periodo 2006-2007 fue el que presento el mayor número de haplotipos (18), pero en su mayoría fueron haplotipos exclusivos (13), en este periodo el haplotipo A no se detectó, los haplotipos D y AC bajaron sus frecuencias, mientras que el haplotipo AA las aumento drásticamente. Los dos últimos periodos 2008-2009 y 2010-2011 fueron los que presentaron el menor número de haplotipos, seis y cinco, respectivamente; en el periodo 2008-2009 los haplotipos A y D aumentaron sus frecuencias drásticamente y el haplotipo AA las bajo, aquí se detectó de nuevo al haplotipo W en un solo parásito, y dos haplotipos exclusivos. Finalmente, en el periodo 2010-2011 solo se

detectaron los haplotipos A, D, AA y AC en frecuencias diferentes, y un haplotipo exclusivo (Figura 6).

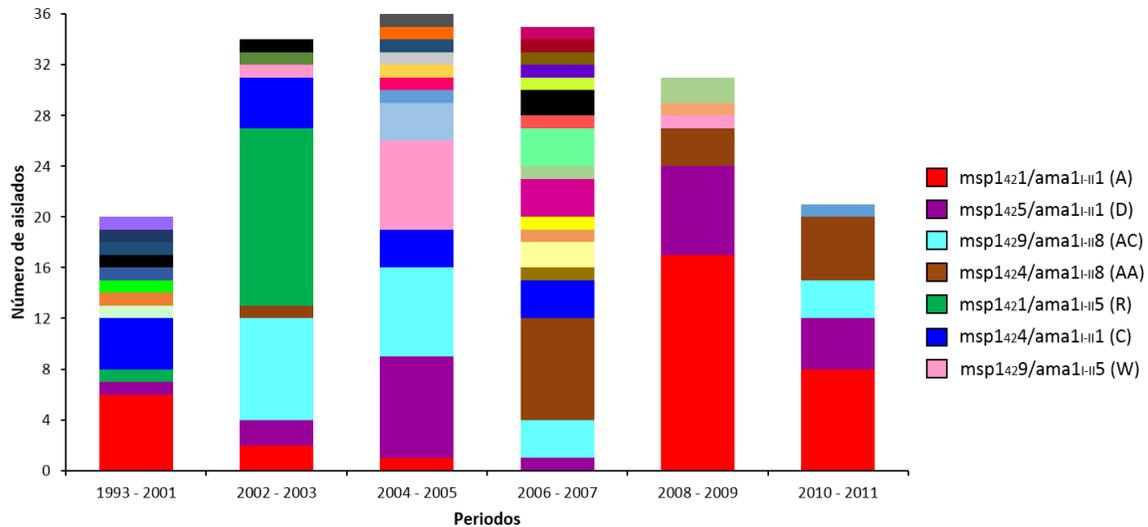


Figura 6. Distribución temporal de los haplotipos definidos por los marcadores *pvmsp142* - *pvama1I* en el sureste de México. De 177 secuencias de ADN se encontraron un total de 38 haplotipos combinados, cada haplotipo está indicado en un color diferente. Solo los haplotipos con un número ≥ 9 individuos son presentados en la leyenda, están ordenados de mayor a menor (A, $n = 34$; D, $n = 23$; AC, $n = 21$; AA, $n = 17$; R, $n = 15$; C, $n = 14$; W, $n = 9$), el resto de los haplotipos tuvo un número de individuos entre 1-4.

Comparación de los parásitos del sureste de México con los de otras regiones geográficas.

Diversidad genética.

La comparación de las 198 secuencias de *pvmsp142* del sureste de México con 809 secuencias de distintos sitios geográficos reveló 117 sitios polimórficos. A nivel global se identificaron 206 haplotipos, de los cuales 102 (47.5 %) fueron universales y 104 (52.5 %) fueron únicos, principalmente en países del sur y sureste de Asia. La diversidad nucleotídica (π) en el sureste de México fue de 0.0219 ± 0.0005 , este valor fue muy similar al de Nicaragua (0.0211 ± 0.0009) que está en fase de control, más alto que el observado en regiones en fases de pre-eliminación y eliminación como Turquía, Singapur y Corea del sur; y con valor más bajo que en regiones en fase de control como Brasil, India-Bangladesh, Sri Lanka, Myanmar, Tailandia y Camboya (Tabla 7). La diversidad haplotípica (Hd) en el sureste de México fue de 0.802 ± 0.014 , solo por arriba de Nicaragua (0.707 ± 0.030) y Turquía (0.536 ± 0.077). La diversidad nucleotídica y haplotípica global fue muy alta ($\pi = 0.0260 \pm 0.0001$ y $Hd = 0.969 \pm 0.003$).

Tabla 7. Parámetros de diversidad genética y recombinación en el marcador *pvmsp1₄₂* del sureste de México.

País	Año de muestreo	Fase al momento del muestreo	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>H</i>	<i>Hd</i> (DE)	π (DE)	<i>DL</i> (<i>R</i> ²)	<i>Rm</i>
SMX	1993 – 2011	Control - pre-eliminación	198	57	17	0.802 ± (0.014)	0.0219 ± (0.0005)	0.3030	12
NIC	2012 – 2013	Control	92	59	8	0.707 ± (0.030)	0.0211 ± (0.0009)	0.3480	11
BRA	1995 y 1997	Control	11	53	8	0.945 ± (0.054)	0.0240 ± (0.0032)	0.3212	10
TUR	2007 – 2008	Pre-eliminación	30	26	3	0.536 ± (0.077)	0.0073 ± (0.0016)	0.7973	0
IND-BAN	1994 2004 – 2007	Control	40	61	30	0.982 ± (0.011)	0.0254 ± (0.0006)	0.2375	14
SLK	1998 – 2000	Control	106	62	46	0.969 ± (0.006)	0.0254 ± (0.0005)	0.2733	23
MYA-CHI	2012	Control	28	58	27	0.993 ± (0.011)	0.0249 ± (0.0011)	0.2519	13
TAI	1991 – 1998 2006 – 2007	Control	206	59	59	0.911 ± (0.015)	0.0236 ± (0.0004)	0.2809	13
CAMB	2006 – 2007	Control	44	56	25	0.931 ± (0.024)	0.0239 ± (0.0006)	0.2916	11
SING	2009	Prevención de reintroducción	50	87	26	0.890 ± (0.032)	0.0200 ± (0.0015)	0.2258	12
COR	1996 – 2013	Eliminación	198	47	10	0.872 ± (0.006)	0.0172 ± (0.0007)	0.3808	4
TOTAL ¹			1007	117	206	0.968 ± (0.002)	0.0260 ± (0.0001)	0.1414	24

Sureste de México (SMX); Nicaragua (NIC); Brasil (BRA); Turquía (TUR); India-Bangladesh (IND-BANG); Sri Lanka (SLK); Myanmar-China (MYA-CHI); Tailandia (TAI); Camboya (CAM); Singapur (SING); Corea (COR).

¹ se sumaron dos secuencias de Vanuatu, GenBank: AF435632 y AF435634.

Las 225 secuencias de *pvama1_{I-II}* del sureste de México fueron comparadas con 729 secuencias previamente reportadas de Venezuela, Irán, India, Sri Lanka, Tailandia, China, Corea y Papúa Nueva Guinea. La comparación resolvió 76 sitios polimórficos que definieron un total de 234 haplotipos (Tabla 8), de los cuales 134 (57.3 %) fueron universales y 100 (42.7%) fueron únicos, principalmente de Irán, Tailandia y Papúa Nueva Guinea. Los valores de diversidad nucleotídica (π) variaron entre 0.0046 ± 0.0002 para Venezuela y 0.0103 ± 0.0009 para Sri Lanka. El sureste de México tuvo un valor de 0.0067 ± 0.0002, superior a los que presentó Venezuela y Corea, regiones en fase de control y eliminación, respectivamente, (Tabla 8). Venezuela, Irán, Sri Lanka, India, Tailandia, China y Papúa Nueva Guinea presentaron valores de diversidad haplotípica (*Hd*) por arriba de 0.9, Corea presentó un valor muy cercano (0.876 ± 0.022) y el sureste de México presentó un valor muy por debajo de 0.9 (0.734 ± 0.021). En general Venezuela, Corea y el sureste de México, regiones de baja

transmisión, presentan la diversidad genética más baja. Por su parte Irán, India, Sri Lanka y Tailandia presentan la diversidad genética más alta. La diversidad nucleotídica y haplotípica global fue alta ($\pi = 0.0088 \pm 0.0001$ y $Hd = 0.975 \pm 0.002$) (Tabla 8).

Tabla 8. Parámetros de diversidad genética y recombinación en el marcador *pvama1_{I-II}* del sureste de México.

País	Año de muestreo	Fase al momento del muestreo	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>H</i>	<i>Hd</i> (DE)	π (DE)	<i>DL</i> (<i>R</i> ²)	<i>Rm</i>
SMX	1993 – 2011	Control - pre-eliminación	225	15	14	0.740 ± (0.020)	0.0067 ± (0.0002)	0.2167	2
VNZ	1996 – 1997	Control	73	11	15	0.904 ± (0.015)	0.0046 ± (0.0002)	0.2077	3
IRÁN	2009 – 2010	Pre-eliminación	101	37	63	0.986 ± (0.004)	0.0095 ± (0.0003)	0.1142	9
INDIA	2007	Control	60	28	42	0.983 ± (0.007)	0.0092 ± (0.0004)	0.1271	6
SLK	2006	Pre-eliminación	23	22	15	0.949 ± (0.028)	0.0103 ± (0.0009)	0.2621	5
TAI	1996 y 2007	Control	231	31	87	0.927 ± (0.012)	0.0101 ± (0.0003)	0.1345	8
CHI	2011 – 2012	Control	73	24	32	0.922 ± (0.022)	0.0084 ± (0.0005)	0.1134	6
COR	2009 – 2011	Eliminación	66	26	16	0.876 ± (0.022)	0.0048 ± (0.0004)	0.1521	1
PNG	2012	Control	102	22	51	0.976 ± (0.005)	0.0074 ± (0.0003)	0.1398	4
TOTAL			954	76	234	0.975 ± (0.002)	0.0088 ± (0.0001)	0.0192	13

Sureste de México (SMX); Venezuela (VZN); Sri Lanka (SLK); Tailandia (TAI); China (CHI); Corea (COR); Papúa Nueva Guinea (PNG).

Recombinación.

En general, para *pvm_{sp}1₄₂* los niveles de desequilibrio de ligamiento (DL) en diferentes regiones geográficas fueron bajos, variaron entre 0.2258-0.7973, el valor más bajo se presentó en Singapur, que está en fase de eliminación, y el más alto en Turquía, región en pre-eliminación, el valor de DL para el sureste de México fue de 0.3324. Las regiones de América (todas en fase de control) presentaron los valores más altos de DL después de Turquía (Tabla 7). El número mínimo de recombinación (*Rm*) varió entre 0-23, la mayoría de las regiones analizadas presentaron ≥ 10 *Rm*, excepto Turquía y Corea del sur, países en fase de pre-eliminación y eliminación, respectivamente (Tabla 7).

En *pvama1_{I-II}* los niveles de DL en diferentes regiones geográficas fueron bajos, variaron entre 0.1134-0.2621, el valor más bajo se presentó en China, que está en fase de control, y el más alto en Sri Lanka, región en fase de pre-eliminación, el valor de DL para el sureste de México fue de 0.2167 (Tabla 8), mucho más bajos que en *pvm_{sp}1₄₂* (Tabla 7). El número mínimo de

recombinación (Rm) varió entre 1-9, el sureste de México, Venezuela, Papúa Nueva Guinea y Corea presentaron $< 5 Rm$ (Tabla 8).

Selección natural.

Se realizaron las pruebas de selección de $dN-dS$ y la prueba de McDonald-Kreitman (MK), ambas pruebas resultaron positivas para todas las regiones analizadas para *pvmsp142*, la prueba de $dN-dS$ no fue significativa para algunas de las regiones, incluyendo el sureste de México, pero la prueba MK resultó altamente significativa para todas las regiones (Tabla 9).

Tabla 9. Estimación de la selección natural en *pvmsp142*.

País	Cambios dentro de las poblaciones de <i>P. vivax</i>		$dN - dS$	Prueba de Z p	Cambios fijados entre especies ¹		McDonald-Kreitman IF	Prueba de Fisher p
	Sinónimas	No sinónimas			Sinónimas	No sinónimas		
SMX	7	38	1.044	0.15	53	63	4.567	0.00047**
NIC	8	45	0.836	0.20	53	64	4.658	0.00012**
BRA	5	40	1.018	0.15	53	63	6.730	0.00002**
TUR	4	22	0.247	0.40	55	74	4.088	0.00841**
IND-BANG	8	45	1.952	0.03*	53	63	4.732	0.00020**
SLK	9	47	1.501	0.07	53	63	4.393	0.00016**
MYA	7	43	2.086	0.02*	53	63	5.168	0.00008**
TAI	8	45	2.632	0.01*	53	63	4.732	0.00020**
CAMB	7	42	2.210	0.01*	53	63	5.048	0.00009**
SING	13	65	2.638	0.01*	53	64	4.141	0.00003**
CHI	7	43	2.387	0.01*	53	63	5.168	0.00008**
COR	3	47	4.153	0.00*	55	64	13.464	0.00000**
Total	23	86	1.912	0.03*	53	62	3.196	0.00008**

Sureste de México (SMX); Nicaragua (NIC); Brasil (BRA); Turquía (TUR); India-Bangladesh (IND-BANG); Sri Lanka (SLK); Myanmar (MYA); Tailandia (TAI); Camboya (CAM); Singapur (SING); China (CHI); Corea (COR). IF, Índice de fijación.

¹ *Plasmodium cynomolgi* fue usado como grupo externo para ambos marcadores (GenBank: AY869723.1). Valores de significancia para la prueba de $dN-dS$ * $p < 0.05$. Valores de significancia para la prueba de McDonald and Kreitman ** $p < 0.01$.

Las pruebas de selección de $dN-dS$ y la prueba de McDonald-Kreitman (MK) para $pvama1_{I-II}$ resultaron positivas en la mayoría de las regiones analizadas, excepto en Tailandia, China y Corea (Tabla 10). La prueba de $dN-dS$ no fue significativa para algunas de las regiones, incluyendo el sureste de México, mientras que la prueba MK resultó altamente significativa para todas las regiones analizadas (Tabla 10).

Tabla 10. Estimación de la selección natural en $pvama1_{I-II}$.

País	Cambios dentro de las poblaciones de <i>P. vivax</i>		$dN - dS$	Prueba de Z	Cambios fijados entre especies ¹		McDonald-Kreitman	Prueba de Fisher
	Sinónimas	No sinónimas			p	Sinónimas		
SMX	1	14	1.544	0.06	52	23	31.652	0.00001**
VNZ	2	9	0.821	0.41	54	28	8.679	0.00591**
IRÁN	4	24	0.844	0.40	51	24	12.750	0.00000**
INDIA	7	23	1.012	0.31	53	24	7.253	0.00002**
SLK	2	21	2.154	0.03	53	24	23.188	0.00000**
TAI	7	19	-0.071	0.94	50	21	8.333	0.00002**
CHI	5	21	-0.349	1.00	53	23	9.678	0.00001**
COR	10	16	-0.425	0.67	51	25	3.264	0.01934**
PNG	4	15	1.725	0.09	51	24	12.750	0.00001**
Total	20	46	0.650	0.03	45	20	5.063	0.00001**

Sureste de México (SMX); Venezuela (VNZ); Sri Lanka (SLK); Tailandia (TAI); China (CHI); Corea (COR); Papúa Nueva Guinea (PNG). IF, Índice de fijación.

¹ *Plasmodium cynomolgi* fue usado como grupo externo para ambos marcadores (GenBank: X66099). Valores de significancia para la prueba de $dN-dS$ * $p < 0.05$. Valores de significancia para la prueba de McDonald and Kreitman ** $p < 0.01$.

Distribución geográfica de los haplotipos $pvmsp1_{42}$ y $pvama1_{I-II}$.

Para los análisis de *splitsree* de los marcadores $pvmsp1_{42}$ y $pvama1_{I-II}$, el total de haplotipos obtenidos de diferentes sitios geográficos fueron asignados por regiones, según su localización geográfica: sureste de México (SMX), Centroamérica, Suramérica, Medio Oriente, Sur de Asia, Sureste de Asia, Este de Asia, y Oceanía.

El análisis para el marcador $pvmsp1_{42}$ reveló que los 206 haplotipos formaron cuatro agrupaciones (Figura 7). De los 17 haplotipos del sureste de México, once fueron exclusivos

del sureste de México (SMXh3, h5, h6, h7, h8, h9, h11, h12, h14, h15 y h16) y seis se compartieron con diferentes regiones (SMXh1, h2, h4, h10, h13 y h17). Los haplotipos SMXh1, SMXh10 y SMXh13 fueron compartidos con Centroamérica, SMXh2 con el sureste de Asia, SMXh4 con Suramérica, Medio Oriente y el Este de Asia, y SMXh17 con el Este de Asia. Se detectaron nueve haplotipos frecuentes ($n > 25$) (Figura 7), entre ellos seis haplotipos detectados en el sureste de México (SMXh1, h4, h5, h9, h13 y h17), un haplotipo compartido entre el sur y este de Asia (h77), y dos exclusivos del sureste de Asia (h106 y h142).

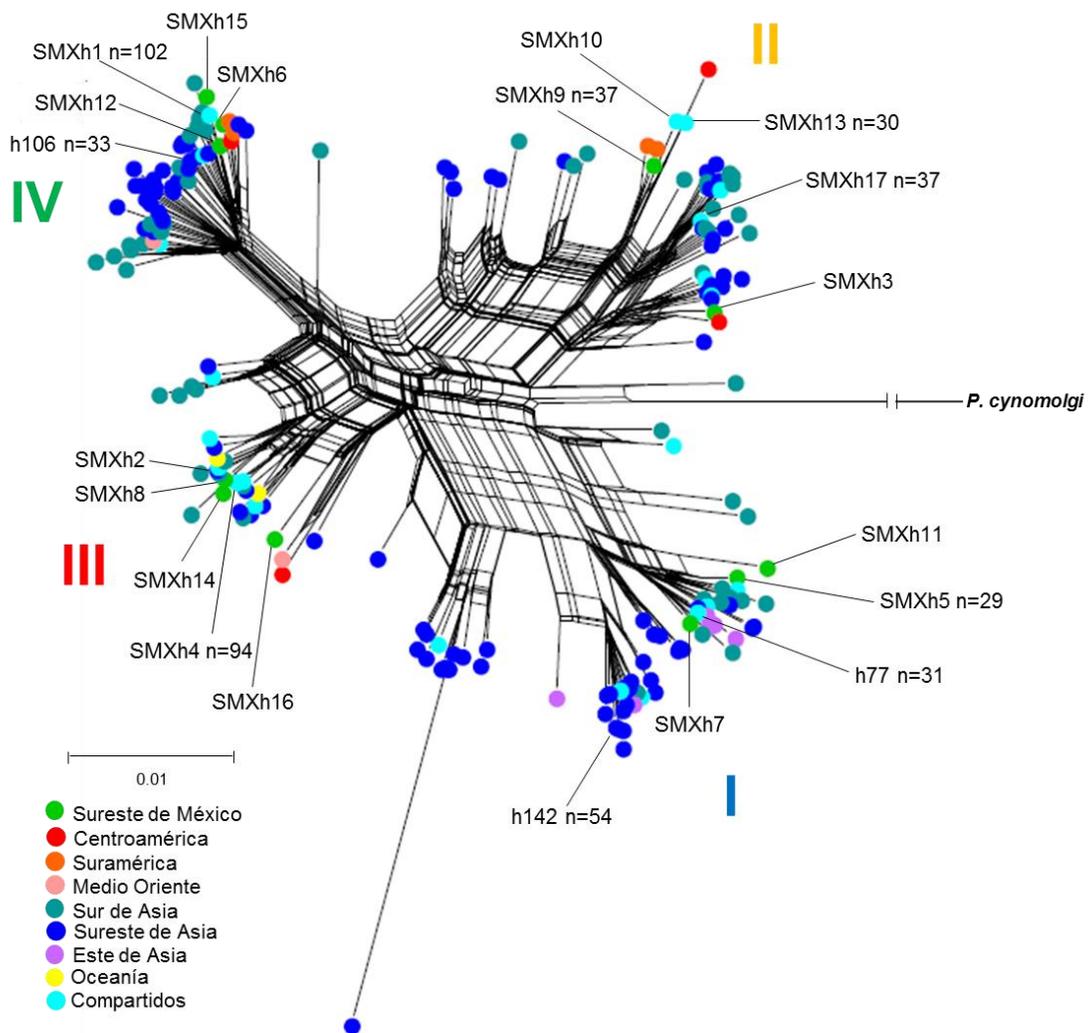


Figura 7. *Splitstree* para *pvmsp142* construida por el método neighbour-net. Cuatro agrupaciones fueron detectadas: I, II, III y IV. Los círculos del mismo color indican haplotipos de la misma región. Los haplotipos más frecuentes (≥ 29) son señalados. *P. cynomolgi* fue usado como grupo externo. La escala indica la sustitución nucleotídica por sitio. Centroamérica (Nicaragua), Suramérica (Brasil), Medio Oriente (Turquía), Sur de Asia (India-Bangladesh y Sri Lanka), Sureste de Asia (Myanmar-China, Tailandia, Camboya y Singapur), Este de Asia (Corea del Sur), y Oceanía (Vanuatu). “Compartidos” indica haplotipos compartidos entre diferentes regiones.

Para el marcador *pvama1_{I-II}*, doscientos treinta y cuatro haplotipos formaron dos grandes agrupaciones (Figura 8). Siete haplotipos exclusivos del sureste de México fueron detectados (SMXh1, h4, h6, h7, h8, h9 y h14) y siete haplotipos compartidos con diferentes regiones (SMXh2, h3, h5, h10, h11, h12 y h13) (Figura 8). El haplotipo SMXh2 fue compartido con Suramérica y Medio Oriente, SMXh3 con Suramérica, Medio Oriente, sur, sureste y este de Asia, SMXh5 con Suramérica, SMXh10 con Medio Oriente y sur de Asia, SMXh11 con Medio Oriente, sur y este de Asia, SMXh12 con Medio Oriente, sur, sureste y este de Asia, y SMXh13 con Suramérica y sur de Asia. Se encontraron siete haplotipos frecuentes ($n > 29$): cuatro en sureste de México (SMXh1, h3, h5 y h8), uno exclusivo del este de Asia (h208) y dos compartidos entre el sur y sureste de Asia (h93 y h152).

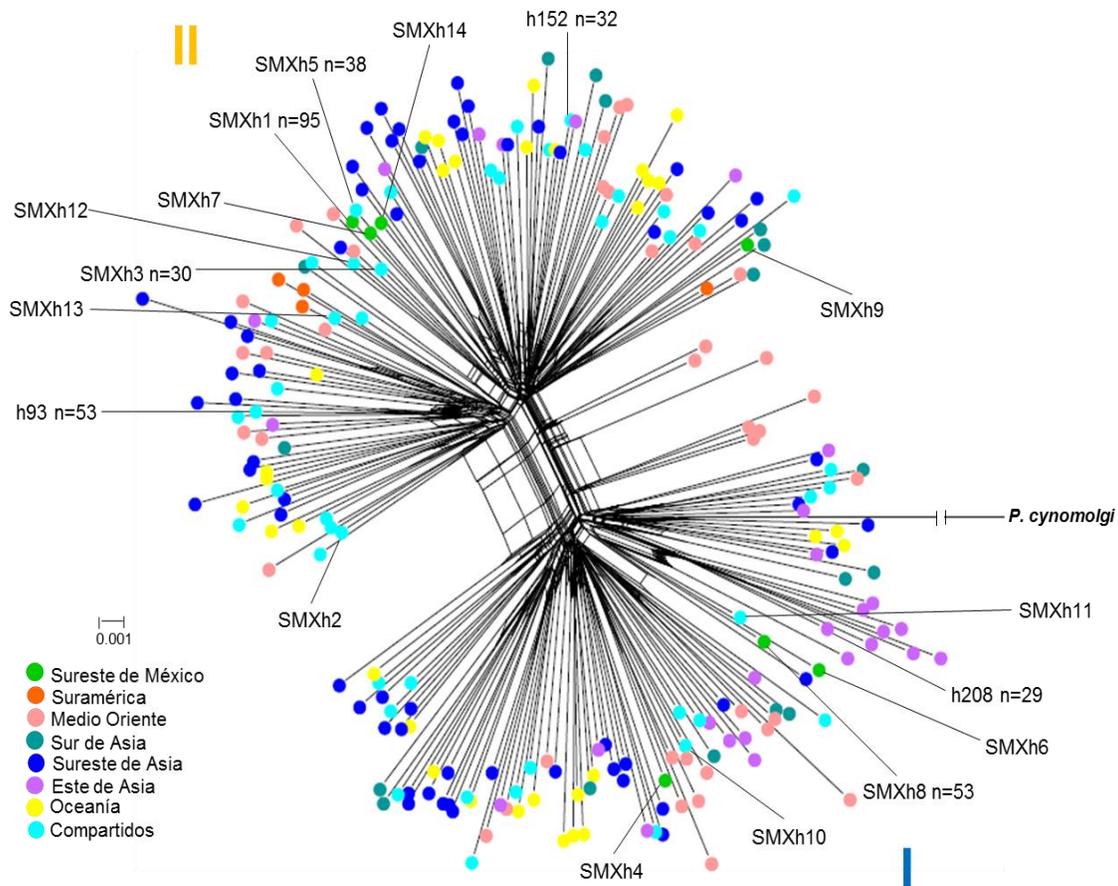


Figura 8. *Splittree* para *pvama1_{I-II}* construida por el método neighbour-net. Cuatro agrupaciones fueron detectadas: I, II, III y IV. Los círculos del mismo color indican haplotipos de la misma región. Los haplotipos más frecuentes (≥ 29) son indicados. *P. cynomolgi* fue usado como grupo externo. La escala indica la sustitución nucleotídica por sitio. Suramérica (Venezuela), Medio Oriente (Irán), Sur de Asia (India y Sri Lanka), Sureste de Asia (Tailandia), Este de Asia (Corea del Sur y China), y Oceanía (Papúa Nueva Guinea). “Compartidos” indica haplotipos compartidos entre diferentes regiones.

En ambos casos, se observó la formación de redes complejas, indicando eventos de recombinación, siendo mayor en *pvmsp142*. Además, no se observó estructuración entre las diferentes regiones analizadas, los haplotipos resultantes por región geográfica se encuentran distribuidos entre las diferentes agrupaciones. *P. cynomolgi* fue utilizado como grupo externo, en la red de *pvama1_{I-II}* se enraíza a la agrupación I, mientras que en la red de *pvmsp142* se enraíza entre las agrupaciones I y II (Figura 7 y 8).

Un análisis filogenético para ambos marcadores confirmó la presencia de las agrupaciones identificadas en el análisis de *splitstree*. En *pvmsp142* se confirmó la presencia de las cuatro agrupaciones con probabilidades posteriores ≥ 0.98 , además se observó que la agrupación IV diverge de la agrupación III. En *pvama1_{I-II}* se observó la presencia de las dos agrupaciones con probabilidades posteriores de uno, la agrupación II diverge de la agrupación I (Figura 9).

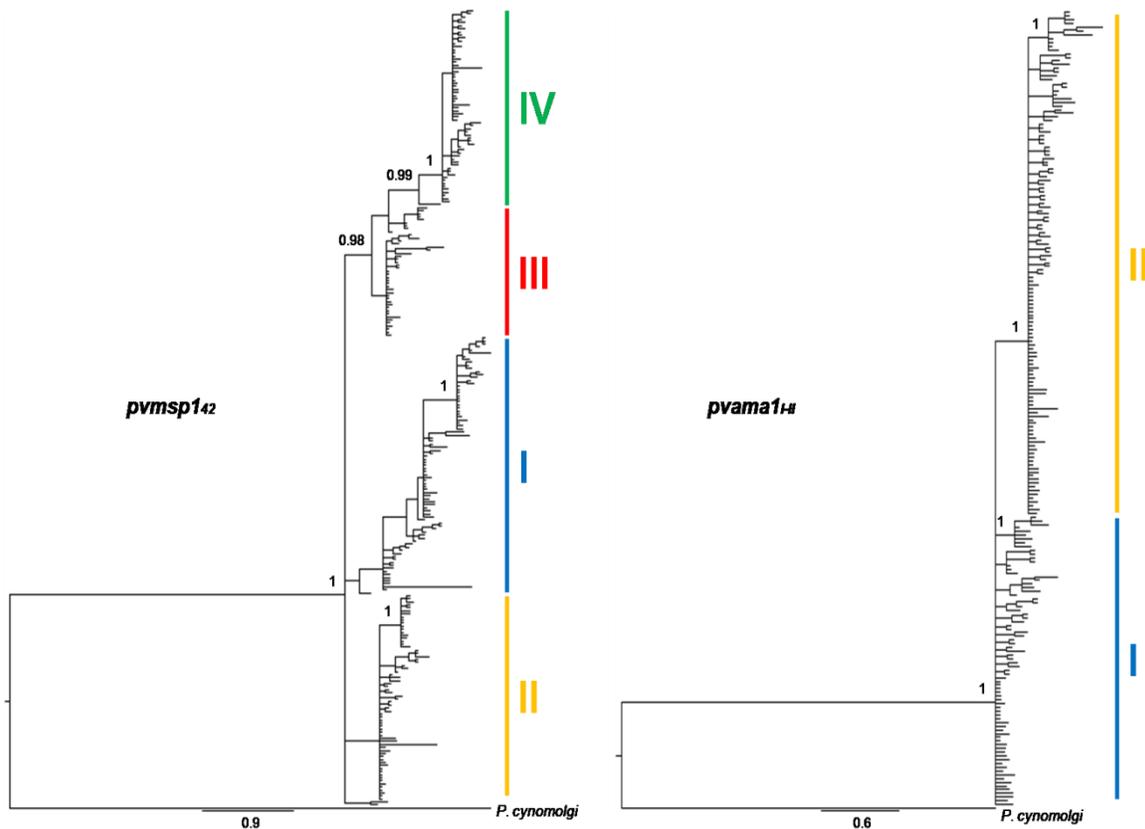


Figura 9. Árbol filogenético de *pvmsp142* y *pvama1_{I-II}*. Los números indican la probabilidad posterior que soporta a cada nodo, solo los nodos principales con probabilidad ≥ 0.98 fueron marcados. Las agrupaciones I, II, III y IV en *pvmsp142* corresponden a los de la figura 7, mientras que las agrupaciones I y II en *pvama1_{I-II}* corresponden a los de la figura 8. *P. cynomolgi* fue utilizado como grupo externo. Las escalas indican la sustitución de nucleótidos por sitio.

Discusión.

Estudios temporales de la diversidad genética de *P. vivax* en regiones endémicas son de gran utilidad para describir su dinámica de transmisión y aportar información para el diseño de vacunas y la vigilancia epidemiológica molecular. En el presente estudio investigamos la diversidad genética de *P. vivax* en la jurisdicción VII del estado de Chiapas, México (sureste de México) durante 19 años de transmisión (1993-2011) utilizando el fragmento de 42KDa del gen *mosp1* y los dominios I y II del gen *ama1* de *P. vivax*. Encontramos que la diversidad genética de ambos marcadores en el sureste de México fue alta ($pvmsp1_{42} > pvama1_{I-II}$). Dicha diversidad se ha mantenido sin cambios durante 1993-2011 como resultado de la persistencia de haplotipos frecuentes, que probablemente han sido resultado de una selección natural balanceadora. Además, el aumento del desequilibrio de ligamiento (DL) y la disminución del número de infecciones con múltiples genotipos (IGMs) indican una transmisión de tipo clonal en donde la recombinación ocurre entre genotipos muy parecidos.

Las campañas de control efectivas en algunas regiones de Tailandia y Turquía han ayudado a la reducción en el número de casos de paludismo y con ello reducción en la diversidad genética (Jongwutiwes *et al.*, 2010; Zeyrek *et al.*, 2010). En el foco de transmisión del sureste de México se ha presentado una tendencia a disminuir el número de casos de paludismo durante el periodo de 1993-2011, resultado de los programas de control del vector, detección activa de casos, administración de fármacos antipalúdicos, experiencia acumulada en el mejoramiento de los programas regionales y la participación comunitaria organizada (Rodríguez-López *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 2003; Betanzos-Reyes, 2011). En un análisis previo con microsatélites en esta región se observó que el decremento del número de casos fue acompañado con un decremento ligero de la heterocigosidad durante 1998-2007, pero fue menos evidente en los últimos años (González-Cerón *et al.*, 2013). En el presente trabajo no se detectó reducción en la diversidad genética en $pvmsp1_{42}$ y $pvama1_{I-II}$. Este fenómeno puede ser explicado por la presencia de haplotipos muy frecuentes y persistentes, los haplotipos h1, h4, h5 y h9 para $pvmsp1_{42}$ y los haplotipos H1, H5 y H8 para $pvama1_{I-II}$, dichos haplotipos representaron el 80 y 85 % de la población, respectivamente.

Un problema en la eliminación de *P. vivax* son las recaídas intermitentes. En regiones tropicales con transmisión persistente las recaídas pueden ocurrir después de semanas, mientras que en zonas templadas con transmisión estacional pueden ocurrir en meses o años (White, 2011). Las recaídas incrementan la probabilidad de que un paciente pueda resguardar parásitos genéticamente diferentes de manera simultánea, los cuales pueden ser liberados al torrente sanguíneo e incrementar la probabilidad de recombinación del parásito en el vector (Soontarawirat *et al.*, 2017). En un grupo de pacientes con recaídas del sureste de México se reportó < 10 % de infecciones con genotipos múltiples (IGMs) (Gonzalez-Ceron *et al.*, 2013).

En el presente estudio, detectamos que el 11.1 y 8.7 % de las muestras fueron IGMs en *pvmmsp1₄₂* y *pvama1_{I-II}*, respectivamente. El mayor número de IGMs en *pvmmsp1₄₂* y *pvama1_{I-II}* fue detectado en el periodo 1993-2001, en este periodo la transmisión de *P. vivax* también fue mayor, lo que en teoría pudo haber aumentado la probabilidad de ser infectado con más de un genotipo del parásito. El número de IGMs para ambos marcadores bajo drásticamente en los años siguientes, 2002-2011. Esta observación podría explicar el aumento temporal de los valores de desequilibrio de ligamiento (DL) durante los años 2000's.

La selección balanceadora mantiene múltiples alelos que persisten en las poblaciones a lo largo del tiempo, los alelos seleccionados al acumular mutaciones pueden generar variantes alélicas que fluctúan por deriva génica (Charlesworth *et al.*, 2006). Se ha reportado que genes que codifican antígenos en *Plasmodium* están bajo selección natural balanceadora como resultado de la presión selectiva del sistema inmune del hospedero (Weedall y Conway, 2010; Barry y Arnott, 2014). Los resultados de las pruebas de *dN-dS* y McDonald-Kreitman sugieren que *pvmmsp1₃₃* de parásitos del sureste de México está bajo selección balanceadora, resultados similares han sido reportados en Sri Lanka (Dias *et al.*, 2011), India (Thakur *et al.*, 2008), Turquía (Zeyrek *et al.*, 2010), Corea (Kang *et al.*, 2012), Camboya (Parobek *et al.*, 2014) y China (Zhou *et al.*, 2017). En *pvama1_{I-II}* detectamos selección balanceadora en todo el fragmento analizado, otros trabajos también la han detectado, principalmente en el dominio I de muestras de Venezuela (Ord *et al.*, 2008), Tailandia (Putaporntip *et al.*, 2009), Papúa Nueva Guinea (Arnott *et al.*, 2013), Irán (Zakeri *et al.*, 2013) y Myanmar-China (Moon *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2016).

Estudios inmuno-epidemiológicos han demostrado respuesta inmune adquirida en contra del fragmento de 33 kDa (Wickramarachchi *et al.*, 2007) y 19 kDa (Barbedo *et al.*, 2007; Wipasa *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2015; Cassiano *et al.*, 2016) de PvMSP1; y en contra del ectodominio de PvAMA1 (Wickramarachchi *et al.*, 2006; Múfalo *et al.*, 2008; Seth *et al.*, 2010; Bueno *et al.*, 2011; Salavatifar *et al.*, 2015). Un estudio reciente determinó que la vida media de esta respuesta inmune en *P. vivax* es menor a los seis meses en regiones de baja transmisión como Brasil y Tailandia, sin reinfecciones o recaídas, después de ese tiempo la inmunidad pasa a ser deficiente (Longley *et al.*, 2017).

En el presente trabajo detectamos alternancia de los haplotipos frecuentes de *pvmmsp1₄₂* y *pvama1_{I-II}*, y de los ocho haplotipos frecuentes resultado de la combinación de ambos marcadores (*pvmmsp1₄₂* - *pvama1_{I-II}*) en el sureste de México. Esta alternancia puede ser resultado de la respuesta al sistema inmune del hospedero, durante una infección la respuesta inmune se genera en contra de antígenos específicos de los parásitos inoculados, esta respuesta protegerá al hospedero en contra de nuevas infecciones con parásitos que lleven

variantes antigénicas muy parecidas, generando fluctuaciones temporales en la prevalencia de variantes antigénicas dentro de las poblaciones del parásito (Yuan *et al.*, 2013).

Por otra parte, la prevalencia de los haplotipos frecuentes sugiere una transmisión de tipo clonal, el sureste de México es una región con transmisión baja, poca probabilidad de que un paciente reciba más de un piquete de mosquito al año y donde las recaídas, en su mayoría, son causadas por genotipos homólogos a la infección primaria (Gonzalez-Ceron *et al.*, 2013). La circulación de genotipos frecuentes en una región de baja transmisión con las características del sureste de México podría reducir la generación de nuevas variantes alélicas por recombinación en el vector, además, la susceptibilidad del parásito por las diferentes especies del vector en la región genera el aislamiento geográfico del parásito (Joy *et al.*, 2008; González-Cerón *et al.*, 2010) reduciendo la probabilidad de recombinación entre haplotipos, si hay recombinación, esta ocurre entre genotipos muy similares o idénticos.

Pocos estudios han investigado la especificidad inmunológica en contra de diferentes variantes alélicas de antígenos del merozoíto. Dias *et al.*, (2011) analizando variantes alélicas del Dominio II de PvAMA1 encontraron una prevalencia de anticuerpos alelo específicos que varió de 0–100 % respecto a la proteína recombinante PV66/AMA-1, solo 5 de las 24 variantes obtuvieron arriba del 80–100% de prevalencia de anticuerpos en aislados clínicos de Sri Lanka. Por el contrario, Salavatifar *et al.*, (2015) con el ectodominio completo de PvAMA1 no demostró diferencias significativas en la generación de anticuerpos entre dos variantes alélicas detectadas en aislados de Irán. Estos resultados sugieren que la variación alélica de un antígeno en respuesta a la inmunidad adquirida también debe de ser estudiada para el diseño de vacunas efectivas.

Observamos diversificación de los haplotipos más divergentes que generaron variantes que fluctuaron en el tiempo y en frecuencias bajas. Este resultado fue más evidente en *pvmsp142*, por ejemplo, el haplotipo h3 que es una variante del haplotipo h4 fue detectado en los periodos 1993 -2001, 2004-2005 y 2006-2007, mientras que los haplotipos h14 y h16 solo se detectaron en el periodo 2006-2007. Además, la acumulación de pasos mutacionales entre haplotipos permitió identificar cuatro haplogrupos separados por al menos 17 pasos mutacionales, cada haplogrupo representado por un haplotipo frecuente y sus variantes. En el caso del marcador *pvama1_{I-II}* no fue tan evidente la formación de haplogrupos, pero la acumulación temporal de pasos mutacionales entre haplotipos sugiere la presencia de dos haplotipos altamente divergentes (H1 y H9). La subdivisión de la población sugiere selección diversificadora, la explicación es que la fijación o eliminación del polimorfismo bajo selección balanceadora puede tomar varias generaciones, tiempo en el cual las regiones aledañas al sitio seleccionado pueden acumular mutaciones y ser mantenidas por *Hitch-hiking*, como consecuencia la diferenciación entre las subpoblaciones aumenta con el tiempo (Schierup *et*

al., 2000; Charlesworth, 2006). *Hitch-hiking* se ha detectado en genes de resistencia a fármacos (*dhfr* y *mrd1*) de *Plasmodium falciparum* (Lumb *et al.*, 2009; Vinayak *et al.*, 2010).

Con respecto a otras regiones geográficas, *pvmsp1₄₂* y *pvama1_{I-II}* del sureste de México presentaron una diversidad genética (π) moderada, más alta que algunas regiones en fase de control, pre-eliminación y eliminación. Contrario al sureste de México donde el número de casos ha disminuido desde los años 1990's y hasta la actualidad, en Corea del sur hubo una reintroducción de *P. vivax* en los años 1990's y la generación de parásitos recombinantes detectada a partir del año 2001 ha provocado que su diversidad genética vaya en aumento (Kang *et al.*, 2012), no obstante los programas de control efectivos han controlado el número de casos y actualmente se considera una región en fase de eliminación (OMS, 2017).

A nivel global, cuatro y dos grupos divergentes en *pvmsp1₄₂* y *pvama1_{I-II}*, respectivamente fueron detectados. En ninguno de los marcadores se distinguieron agrupaciones geográficas. El número de eventos mínimos de recombinación y la red *splitstree* sugiere alta recombinación en ambos marcadores, siendo *pvmsp1₄₂* > *pvama1_{I-II}*. El enramado detectado en el *splitstree* sugiere recombinación entre parásitos de diferentes regiones. Por otra parte, la presencia de pequeñas agrupaciones de parásitos en el sureste y este de Asia y el Medio Oriente indican recombinación entre individuos de la misma región. La recombinación detectada en el sureste de México podría ser por eventos antiguos entre diferentes linajes, posiblemente provenientes del sureste de Asia y el Medio Oriente (González-Cerón *et al.*, 2010; Gonzalez-Ceron *et al.*, 2013; Cerritos *et al.*, 2014), seguida de una diversificación y expansión local. Este supuesto es apoyado por resultados previos con los bloques icb5-6 de *pvmsp1* que sugieren procesos de recombinación entre linajes genealógicamente separados y una posterior divergencia y expansión poblacional en el sureste de México (Cerritos *et al.*, 2014).

Conclusiones.

Los índices de diversidad genética pueden ser indicativos de la adaptación y adecuación de las poblaciones de *Plasmodium* como respuesta al sistema inmune del hospedero y/o a las intervenciones de control, como resistencia a fármacos. Así, el estudio de los cambios genéticos en el tiempo puede ayudar a identificar las fluctuaciones y relación genética de los haplotipos que han persistido en una región endémica de *P. vivax*.

Del presente trabajo concluimos que en el sureste de México:

- La población de *P. vivax* presenta haplotipos frecuentes y divergentes: cuatro de *pvmsp1₄₂* y dos de *pvama1_{I-II}*.
- La diversidad genética en los marcadores *pvmsp1₄₂* y *pvama1_{I-II}* es moderada y se ha mantenido en el tiempo por la prevalencia de haplotipos altamente frecuentes.

- La disminución de la transmisión del paludismo fue acompañada por la disminución en el número de infecciones con genotipo múltiple e incremento en el desequilibrio de ligamiento en *pvmsp1₄₂* y *pvama1_{I-II}*.
- *P. vivax* presentó una transmisión de tipo clonal durante 1993-2011, en donde la recombinación ocurre, pero es difícil de detectarla entre genotipos muy cercanos o idénticos.
- Las pruebas de selección natural, subdivisión poblacional y la presencia de cuatro y dos alelos frecuentes en *pvmsp1₄₂* y *pvama1_{I-II}*, respectivamente, indican que ambos marcadores están bajo selección natural balanceadora.

Referencias.

- Arévalo-Herrera M, Chitnis C, Herrera S. Current status of *Plasmodium vivax* vaccine. *Hum Vaccin*. 2010; 6(1):124–32.
- Arnott A, Barry AE, Reeder JC. Understanding the population genetics of *Plasmodium vivax* is essential for malaria control and elimination. *Malar J*. 2012; 11:14.
- Arnott A, Mueller I, Ramsland PA, Siba PM, Reeder JC, Barry AE. Global population structure of the genes encoding the malaria vaccine candidate, *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (PvAMA1). *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(10):e2506.
- Barbedo MB, Ricci R, Jimenez MC, Cunha MG, Yazdani SS, Chitnis CE, et al. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102(3):335–9.
- Barry AE, Arnott A. Strategies for designing and monitoring malaria vaccines targeting diverse antigens. *Front Immunol*. 2014; 5:359.
- Barry AE, Waltmann A, Koepfli C, Barnadas C, Mueller I. Uncovering the transmission dynamics of *Plasmodium vivax* using population genetics. *Pathogens and Global Health*. 2015; 109(3):142–52.
- Betanzos-Reyes AF. La malaria en México. Progresos y desafíos hacia su eliminación. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2011; 68(2):159–168.
- Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. 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. *J Exp Med*. 1990; 172(1):379–82.
- Bueno LL, Lobo FP, Morais CG, Mourão LC, de Ávila RA, Soares IS, et al. Identification of a highly antigenic linear B cell epitope within *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1). *PLoS One*. 2011; 6(6):e21289.
- Cassiano GC, Furini AA, Capobianco MP, Storti-Melo LM, Almeida ME, Barbosa DR, et al. Immunogenetic markers associated with a naturally acquired humoral immune response

against an N-terminal antigen of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 (PvMSP-1). *Malar J.* 2016; 15:306.

- Cerritos R, González-Cerón L, Nettel JA, Wegier A. Genetic structure of *Plasmodium vivax* using the merozoite surface protein 1 icb5-6 fragment reveals new hybrid haplotypes in southern Mexico. *Malar J.* 2014; 13:35.
- Charlesworth D. Balancing selection and its effects on sequences in nearby genome regions. *PLoS Genet.* 2006; 2(4):e64.
- Cowman AF, Berry D, Baum J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J Cell Biol.* 2012; 198(6):961–71.
- Daniels RF, Rice BL, Daniels NM, Volkman SK, Hartl DL. The utility of genomic data for *Plasmodium vivax* population surveillance. *Phatog Glob Health.* 2015; 109(3):153–61.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R and Posada D. “jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing”. *Nat Methods.* 2012; 9(8):772.
- Dias S, Longacre S, Escalante AA, Udagama-Randeniya PV. Genetic diversity and recombination at the C-terminal fragment of the merozoite surface protein-1 of *Plasmodium vivax* (PvMSP-1) in Sri Lanka. *Infect Genet Evol.* 2011; 11(1):145–56.
- Dirección General de Epidemiología (DGE). (26 de abril de 2017) Boletín epidemiológico. Recuperado de: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/historico-boletin-epidemiologico>
- Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol.* 1981; 17(6):368–76.
- Flores-Alanis A, González-Cerón L, Santillán F, Ximenes C, Sandoval MA, Cerritos R. Temporal genetic changes in *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 over 19 years of transmission in southern Mexico. *Parasit Vectors.* 2017; 10(1):217.
- González-Cerón L, Alvarado-Delgado A, Martínez-Barnette J, Rodríguez MH, Ovilla-Muñoz M, Pérez F, *et al.* Sequence variation of ookinete surface proteins Pvs25 and Pvs28 of *Plasmodium vivax* isolates from southern Mexico and their association to local anophelines infectivity. *Infect Genet Evol.* 2010; 10(5):645–54.
- González-Cerón L, Cerritos R, Corzo-Mancilla J, Santillán F. Diversity and evolutionary genetics of the three major *Plasmodium vivax* merozoite genes participating in reticulocyte invasion in southern Mexico. *Parasit Vectors.* 2015; 8(1):651.
- González-Cerón L, Martínez-Barnette J, Montero-Solís C, Santillán F, Soto AM, Rodríguez MH, *et al.* Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax* in Latin America: polymorphism and evolutionary relationships of the circumsporozoite gene. *Malar J.* 2013; 12:243.
- Gonzalez-Ceron L, Rodriguez MH, Nettel JA, Villarreal C, Kain K, Hernandez, JE. Differential susceptibilities of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* to infection with

- coindigenous *Plasmodium vivax* variants VK210 and VK247 in Southern Mexico. *Infect Immun*. 1999; 67(1):410–2.
- Gonzalez-Ceron L, Rodriguez MH, Wirtz RA, Sina BJ, Palomeque OL, Nettel JA, *et al*. *Plasmodium vivax*: a monoclonal antibody recognized a circumsporozoite protein precursor on the sporozoite surface. *Exp Parasitol*. 1998; 90(3):203–11.
 - Gunasekera AM, Wickramarachchi T, Neafsey DE, Ganguli I, Perera L, Premaratne PH, *et al*. Genetic diversity and selection at the *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 (PvAMA1) locus in a Sri Lankan population. *Mol Biol Evol*. 2007; 24(4):939–47.
 - Gutiérrez S, González-Cerón L, Montoya A, Sandoval MA, Tórres ME, Cerritos R. Genetic structure of *Plasmodium vivax* in Nicaragua, a country in the control phase, based on the carboxyl terminal region of the merozoite surface protein-1. *Infect Genet Evol*. 2016; 40: 324–330.
 - Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequences alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*. 1999; 41:95–98.
 - Han ET, Wang Y, Lim CS, Cho JH, Chai JY. Genetic diversity of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium vivax* field isolates in Republic of Korea. *Parasitol Res*. 2011; 109(6):1571–6.
 - Hodder AN, Crewther PE, Matthew ML, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, *et al*. The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. *J Biol Chem*. 1996; 271(46):29446–52.
 - Holder AA. The precursor to major merozoite surface antigens: structure and role in immunity. *Prog Allergy*. 1988; 41:72–79.
 - Hudson DH, Bryan D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol*. 2006; 23(2):254–267.
 - Jongwutiwes S, Putaporntip C, Hughes AL. Bottleneck effects on vaccine-candidate antigen diversity of malaria parasites in Thailand. *Vaccine*. 2010; 28(18):3112–7.
 - Joy DA, Gonzalez-Ceron L, Carlton JM, Gueyes A, Fay M, McCutchan TF, *et al*. Local adaptation and vector-mediated population structure in *Plasmodium vivax* malaria. *Mol Biol Evol*. 2008; 25(6):1245–52.
 - Kang JM, Ju HL, Kang YM, Lee DH, Moon SU, Sohn WM, *et al*. Genetic polymorphism and natural selection in the C-terminal 42 kDa region of merozoite surface protein-1 among *Plasmodium vivax* Korean isolates. *Malar J*. 2012; 11:206.
 - Leigh JW, Bryant D. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol*. 2015; 6(9):1110–1116.
 - Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009; 25(11):1451–1452.

- Longley RJ, White MT, Takashima E, Morita M, Kanoi BN, Li Wai Suen CSN, *et al.*, Naturally acquired antibody response to more than 300 *Plasmodium vivax* proteins in three geographic regions. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; 11(9):e0005888.
- Lumb V, Das Mk, Singh N, Dev V, Wajihullah, Sharma YD. Characteristics of genetic hitchhiking around dihydrofolate reductase gene associated with pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(12):5173–80.
- McDonald JH, Kreitman M. Adaptive protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila*. *Nature.* 1991; 351(6328):652–4.
- Moon SU, Na BK, Kang JM, Kim JY, Cho SH, Park YK, *et al.* Genetic polymorphism and effect of natural selection at domain I of apical membrane antigen-1 (AMA-1) in *Plasmodium vivax* isolates from Myanmar. *Acta Trop.* 2010; 114(2); 71–5.
- Múfalo BC, Gentil F, Bargieri DY, Costa FT, Rodrigues MM, Soares IS. *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. *Microbes Infect.* 2008; 10(12–13):1266–73.
- Muse SV, Gaut BS. A likelihood approach for comparing synonymous and nonsynonymous nucleotide substitution rates, with application to the chloroplast genome. *Mol Biol Evol.* 1994; 11(5):715–24.
- Ng LC, Lee KS, Tan CH, Ooi PL, Lam-Phua SG, Lin R, *et al.* Entomologic and molecular investigation into *Plasmodium vivax* transmission in Singapore, 2009. *Malar J.* 2010; 9:305.
- Ord RL, Tami A, Sutherland CJ. *Ama1* genes of sympatric *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* from Venezuela differ significantly in genetic diversity and recombination frequency. *PLoS One.* 2008; 3(10):e3366.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2010). World Malaria Report 2010. Recuperado de: http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/en/
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (29 de noviembre de 2017). World Malaria Report 2017. Recuperado de: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/en/>
- Parobek CM, Bailey JA, Hathaway NJ, Socheat D, Rogers WO, Juliano JJ. Differing patterns of selection and geospatial genetic diversity within two leading *Plasmodium vivax* candidate vaccine antigens. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(4):e2796.
- Pizarro JC, Normand BV-L, Chesne-Seck M-L, Collins CR, Withers-Martinez C, Hackett F, *et al.* Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. *Science.* 2005; 308(5720):408–11.
- Putaporntip C, Jongwutiwes S, Grynberg P, Cui L, Hughes AL. Nucleotide sequence polymorphism at the apical membrane antigen-1 locus reveals population history of *Plasmodium vivax* in Thailand. *Infect Genet Evol.* 2009; 9(6):1295–300.

- Putaporntip C, Jongwutiwes S, Sakihama N, Ferreira MU, Kho WG, Kaneko A, *et al.* Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(25):16348–53.
- Putaporntip C, Jongwutiwes S, Seethamchai S, Kanbara H, Tanabe K. Intragenic recombination in the 3' portion of the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium vivax*. *Mol Biochem Parasitol*. 2000; 109(2):111–9.
- Rodríguez AD, Penilla RP, Henry-Rodríguez M, Hemingway J, Francisco-Betanzos A, Hernández-Avila JE. Knowledge and beliefs about malaria transmission and practices vector control in southern Mexico. *Salud Publica Mex*. 2003; 45(2):110–6.
- Rodriguez MH, Gonzalez-Ceron L, Hernandez JE, Nettel JA, Villarreal C, Kain KC, *et al.* Different prevalences of *Plasmodium vivax* phenotypes VK210 and VK247 associated with the distribution of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* in Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 2000; 62(1):122–7.
- Rodríguez-López MH, Loyola-Elizondo EG, Betanzos-Reyes AF, Villarreal-Treviño C, Bown DN. The focal control of malaria. Focal treatment using chemoprophylaxis and home insecticide spraying for the control of malaria in southern Mexico. *Gad Med Mex*. 1994; 130(5):313–9.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, *et al.* MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol*. 2012; 61(3):539–542.
- Salavatifar M, Zakeri S, Abouie Mehrizi A, Mirkhazemi S, Dinparast DN. Evaluation of naturally acquired antibody responses to two variant forms of *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 in individuals living in areas of low and unstable malaria transmission of Iran. *Arch Iran Med*. 2015; 18(12):834–43.
- Schierup MH, Vekemans X, Charlesworth D. The effect of subdivision on variation at multi-allelic loci under balancing selection. *Genet Res*. 2000; 76(1):51–62.
- Seth RK, Bhat AA, Rao DN, Biswas S. Acquired immune response to defined *Plasmodium vivax* antigens in individuals residing in northern India. *Microbes Infect*. 2010; 12(3):199–206.
- Sheikh IH, Kaushal DC, Singh V, Kumar N, Chandra D, Kaushal NA. Cloning, overexpression and characterization of soluble 42kDa fragment of merozoite surface protein-1 of *Plasmodium vivax*. *Protein Expr Purif*. 2014; 103:64–74.
- Soontarawirat I, Andolina C, Paul R, Day NPJ, Nosten F, Woodrow CJ, *et al.*, *Plasmodium vivax* genetic diversity and heterozygosity in blood samples and resulting oocysts at the Thai-Myanmar border. *Malar J*. 2017; 16(1):355.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013; 30(12):2725–9.

- Templeton AR, Sing CF. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics*. 1993; 134(2):659–69.
- Thakur A, Alam MT, Sharma YD. Genetic diversity in the C-terminal 42 kDa region of merozoite surface protein-1 of *Plasmodium vivax* (PvMSP-1(42)) among Indian isolates. *Acta Trop*. 2008; 108(1):58–63.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22(22):4673–80.
- Vicentin EC, Franoso KS, Rocha MV, Iourtov D, dos Santos FL, Kubrusly FS, *et al*. Invasion-inhibitory antibodies elicited by immunization with *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 expressed in *Pichia pastoris* yeast. *Infect Immun*. 2014; 82(3):1296–307.
- Vinayak S, Alam MT, Sem R, Shah NK, Susanti AI, Lim P, *et al*. Multiple genetic backgrounds of the amplified *Plasmodium falciparum* multidrug resistance (*pfmdr1*) gene and selective sweep of 184F mutation in Cambodia. *J Infect Dis*. 2010; 201(10):1551–60.
- Weedall GD, Conway DJ. Detecting signatures of balancing selection to identify targets of anti-parasite immunity. *Trends Parasitol*. 2010; 26(7):363–9.
- White NJ. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*. 2011; 10:297.
- Wickramarachchi T, Illeperuma RJ, Perera L, Bandara S, Holm I, Longacre S, *et al*. Comparison of naturally acquired antibody response against C-terminal processing products of *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 under low transmission and unstable malaria conditions in Sri Lanka. *Int J Parasitol*. 2007; 37(2):199–208.
- Wipasa J, Suphavitai C, Okell LC, Cook J, Corran PH, Thaikla K, *et al*. Long-lived antibody and B Cell memory response to the human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *PLoS Pathog*. 2010; 6(10):e1000770.
- Wright GJ, Rayner JC. *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion: combining function with immune evasion. *PLoS Pathog*. 2014; 10(3):e10003943.
- Xia H, Fang Q, Jangpatarapongsa K, Zhiyong T, Cui L, Li B, *et al*. A comparative study of natural immune responses against *Plasmodium vivax* C-terminal merozoite surface protein-1 (PvMSP-1) and apical membrane antigen-1 (PvAMA-1) in two endemic settings. *EXCLI J*. 2015; 14:926–34.
- Yuan L, Zhao H, Wu L, Li X, Parker D, Xu S, *et al*. *Plasmodium falciparum* populations from northeastern Myanmar display high levels of genetic diversity at multiple antigenic loci. *Acta Trop*. 2013; 125(1):53–9.

- Zakeri S, Sadeghi H, Mehrizi AA, Djadid ND. Population genetic structure and polymorphism analysis of gene encoding apical membrane antigen-1 (AMA1) of Iranian *Plasmodium vivax* wild isolates. *Acta Trop*. 2013; 126(3):269–79.
- Zeyrek FY, Tachibana S, Yuksel F, Doni N, Palacpac N, Arisure N, *et al*. Limited polymorphism of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 gene in isolates from Turkey. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 83(6):1230–7.
- Zhou X, Tambo E, Su J, Fang Q, Ruan W, Chen JH, *et al*. Genetic diversity and natural selection in 42 kDa region of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 from China-Myanmar endemic border. *Korean J Parasitol*. 2017; 55(5):473–480.
- Zhu X, Zhao P, Wang S, Liu F, Liu J, Wang J, *et al*. Analysis of *Pvama1* gene from China-Myanmar border reveals little region genetic differentiation of *Plasmodium vivax* populations. *Parasit Vectors*. 2016; 9(1):614.

RESEARCH

Open Access



Temporal genetic changes in *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 over 19 years of transmission in southern Mexico

Alejandro Flores-Alanís¹, Lilia González-Cerón^{2*}, Frida Santillán², Cecilia Ximenez³, Marco A. Sandoval² and René Cerritos^{1*}

Abstract

Background: Mexico advanced to the pre-elimination phase in 2009 due to a significant reduction in malaria cases, and since 2000, *Plasmodium vivax* is the only species transmitted. During the last two decades, malaria transmission has been mostly local and isolated to a few regions. It is important to gain further insights into the impact of control measures on the parasite population structure. Hence, the aim of the current study was to determine detailed changes in *P. vivax* genetic diversity and population structure based on analysing the gene that encodes the apical membrane antigen 1 (*pvama1*). This analysis covered from control to pre-elimination (1993–2011) in a hypo-endemic region in southern Mexico.

Results: The 213 *pvama1*₁₋₁₁ sequences presently analysed were grouped into six periods of three years each. They showed low genetic diversity, with 15 haplotypes resolved. Among the DNA sequences, there was a gradual decrease in genetic diversity, the number of mixed genotype infections and the intensity of positive selection, in agreement with the parallel decline in malaria cases. At the same time, linkage disequilibrium (R^2) increased. The three-dimensional haplotype network revealed that *pvama1*₁₋₁₁ haplotypes were separated by 1–11 mutational steps, and between one another by 0–3 unsampled haplotypes. In the temporal network, seven haplotypes were detected in at least two of the six-time layers, and only four distinct haplotypes were evidenced in the pre-elimination phase. Structure analysis indicated that three subpopulations fluctuated over time. Only 8.5% of the samples had mixed ancestry. In the pre-elimination phase, subpopulation P1 was drastically reduced, and the admixture was absent.

Conclusions: The results suggest that *P. vivax* in southern Mexico evolved based on local adaptation into three “pseudoclonal” subpopulations that diversified at the regional level and persisted over time, although with varying frequency. Control measures and climate events influenced the number of malaria cases and the genetic structure. The sharp decrease in parasite diversity and other related genetic parameters during the pre-elimination phase suggests that malaria elimination is possible in the near future. These results are useful for epidemiological surveillance.

Keywords: *Plasmodium vivax*, Apical membrane antigen 1, Southern Mexico, *pvama1*₁₋₁₁, Genetic structure, Evolution, Allelic frequency, Temporal haplotype network

* Correspondence: lgonzal@insp.mx; reneccerritos@gmail.com

²Centro Regional de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud Pública, Tepic, Jalisco 48000, Mexico

³División de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Plasmodium vivax is the most prevalent malaria species in Latin America, the Middle East, South and Southeast Asia, Oceania and The Horn of Africa [1]. In these regions, more than 2.5 billion people are at risk [1], and approximately 13.8 million cases were reported in 2014 [2]. During the 2000–2014 period in Latin America, malaria cases gradually diminished from 1.2 million to 390,000 cases, representing a 74% decline. Argentina, Paraguay and Costa Rica are in the elimination phase, while Belize, Dominican Republic, Ecuador, El Salvador and Mexico are in the pre-elimination phase [2].

In Mexico, the annual number of malaria cases fluctuated between 20,000 and 130,000 in the 1980s. Since the late 90's, the improvement of strategies and efforts by the malaria national control program has driven a continuous decrease in malaria incidence, with only *P. vivax* causing cases of autochthonous transmission. The Pacific coast is the location of almost all transmission, mainly near the boundaries between Mexico and Guatemala as well as between the states of Chihuahua, Sinaloa and Sonora, as well as Durango and Nayarit. In the former case, along the Mexican side of the border is the State of Chiapas, and transmission occurs at the pacific side and in the Lacandon rainforest [3, 4].

Plasmodium vivax is haploid in the human host [5], which facilitates the haplotype assembly when analysing human blood stages. It has been found that this species is indeed genetically diverse worldwide [6, 7] and that the haplotype frequency can be modified by evolutionary forces such as mutation, natural selection, migration and genetic drift [8–10]. The understanding of how these forces induce *P. vivax* populations to differentiate and expand in time and space [11] are relevant for epidemiological surveillance and essential for the design and evaluation of control and elimination strategies. To study the genetic diversity of *P. vivax*, different molecular markers have been used, including microsatellites [7, 12–15], mitochondrial genes [16–18] and genes encoding antigenic molecules [19–22]. Many blood stage antigens especially those involved in immune evasion are highly polymorphic; they evolve more rapidly than neutral markers and allow high resolution of parasite haplotypes [23].

The apical membrane antigen 1 (*ama1*) gene is located on chromosome 9 and encodes an integral membrane protein type I, considered as a strong vaccine candidate (AMA1). This antigen has an ectodomain that plays a key role in the reorientation of the merozoite during the invasion of red blood cells [24, 25]. The ectodomain comprises three domains: domain I, domain II and domain III [26, 27]. In domain DI of *P. vivax*, most studied, higher nonsynonymous than synonymous nucleotide changes have been detected in isolates from distinct regions such

as Asia [28–31], Oceania [22], the Middle East [32] and Latin America [33].

The *P. vivax* population is genetically unique in southern Mexico. By using microsatellite markers, three subpopulations related to mosquito specificity and geographical distribution were identified [12]. Accordingly, the ookinete Pvs25-28 polymorphism was associated with vector compatibility [34]. The icb5-6 blocks of *pvmspi* revealed new hybrid lineages that diversified, possibly because of recombination between divergent haplotypes from South America and Asia [35]. In addition, the analysis of *Pvama1_{I-II}* in a limited number of samples from 2006–2007, exposed that this gene fragment had moderate genetic diversity and was found under balancing selection [36].

Population and evolutionary genetics provide knowledge about how selective forces are networking in any species. This knowledge is useful for evaluating the impact of control and elimination measures on the population structure of vector parasites. Hence, the aim of the current longitudinal study was to investigate changes in *P. vivax* diversity and population structure over 19 years, based on analysis of *pvama1_{I-II}* in samples taken in southern Mexico. The study was from 1993 to 2011, a period comprising control and pre-elimination phases.

Methods

Plasmodium vivax samples

A total of 288 samples (105 of whole blood and 183 of blood smeared on filter paper) had been previously obtained from symptomatic patients, for about two-decade period since 1993 [37–39]. The *P. vivax* diagnosis was carried out at the laboratory facility of the Regional Center for Research in Public Health (CRISP-INSP). Patients lived in Jurisdiction VII of the State of Chiapas in Mexico, which comprises an area of 4644.07 km² of tropical and temperate regions, with the altitude ranging from sea level to foothills up to 4,000 m above sea level. The number of *P. vivax* samples analyzed per year were as follows: 1993, *n* = 12; 1994, *n* = 25; 1995, *n* = 8; 1996, *n* = 4; 1997, *n* = 18; 1998, *n* = 18; 1999, *n* = 21; 2000, *n* = 17; 2001, *n* = 11; 2002, *n* = 19; 2003, *n* = 22; 2004, *n* = 20; 2005, *n* = 21; 2008, *n* = 22; 2009, *n* = 20; 2010, *n* = 17; and 2011, *n* = 13. DNA extraction was carried out with the QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Redwood City, CA, USA), following the manufacturer's instructions.

Pvama1_{I-II} amplification and sequencing

A DNA fragment comprising domains DI and DII (*pvama1_{I-II}*) was amplified. The reaction mixture consisted of 5 µl of 10× reaction buffer (600 mM Tris-SO₄ at pH 8.9 and 180 mM (NH₄)₂SO₄, 2 µl of MgSO₄ (2 mM), 1 µl of dNTPs (0.2 mM), 1.8 µl of each primer at 36 pM (PvPvama1F 5'-TCC AGC

IGG AAG ATG TCC TG-3' and Pvama1R 5'-CCG CCC TTT TCT CTA CAC AG-3'), 0.2 µl enzyme Platinum® *Taq*DNA Polymerase High Fidelity Invitrogen™ (1 U per reaction), and 2–4 µl of DNA. The final volume was adjusted to 50 µl. The PCR conditions were as follows: the first cycle at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles at 95 °C for 60 s, one cycle at 61 °C for 60 s, another at 72 °C for 75 s, and a final cycle at 72 °C for 10 min. The reactions were performed in a Thermal Cycler 2720 thermocycler (Applied Biosystems®, CA, USA). The samples that produced little or no visible PCR product were re-amplified with a nested PCR by using primers Pvama1F and Pvama1R2 5'-CGC AGG GAC ATT TGA TAC TCT CC-3' and 1–2 µl of PCR product from the first PCR reaction.

The PCR-amplified products were separated by electrophoresis with agarose gels at 1%. For visualisation, 0.2 µg/ml ethidium bromide was added, and they were observed in an ultraviolet light chamber. The PCR products of approximately 1,100 bp were purified using the MinElute® PCR Purification Kit (Qiagen, Redwood City, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The purified DNA samples were sequenced on an ABI 3730xl DNA Analyzer (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) in the High-Performance Center in Genomics (Seattle, WA, USA).

The electropherograms of 24 samples showed double peaks, suggesting mixed genotype infections. Therefore, DNA fragments obtained from the first PCR were cloned by using the TOPO TA Cloning Kit with pCR® 2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). For each isolate, three to five different clones were sequenced.

The nucleotide sequences were revised by using the BioEdit version 5.0.9 Sequencing Alignment Editor Copyright © program and aligned with Clustal W [40], utilising the sequence of strain Sal T as a reference. The consensus sequences were deposited in the GenBank database (Accession numbers: KY094724–KY094901).

Genetic analyses

The population genetic analysis was performed for all samples ($n = 213$) and for subgroups (defined by time periods). DnaSP v5.1 was used to determine the number of polymorphisms (S), haplotypes (h), and synonymous (dS) and non-synonymous (dN) changes, as well as the minimum number of recombination events (R_m), the haplotype diversity (H_d), genetic diversity (indexes π and θ), and linkage disequilibrium (LD) given by index R^2 . Moreover, to ascertain whether the observed diversity departs from neutrality, the difference between the substitution rates of nonsynonymous (dN) and synonymous (dS) nucleotide changes ($dN - dS$) was evaluated within populations by using the MEGA v6.0 program [41]. This

estimation was based on the maximum joint likelihood reconstruction of ancestral states under the models of Muse-Gaut [42] and substitution of codons [43]. In addition, data from the neutrality test McDonald-Kreitman was calculated [44] with DnaSP v5.1. As the outgroup, a *Plasmodium cynomolgi* sequence was used (GenBank X66099.1) [45].

Plasmodium vivax haplotype networks were constructed to investigate their genetic relationships, which change over time. First, all the sequences from the parasites in southern Mexico were included to prepare the “master” haplotype network with the TCS 2.21 program. This network was the template to prepare the layers of the temporal network, one per period. The networks were piled up to produce a three-dimensional effect, thus facilitating a comparison of the relationships of the haplotypes and their frequency. The relationship between haplotypes was resolved through mutational steps, which allowed for the assignment of existing haplotypes to a common ancestor of the population [46].

STRUCTURE (v2.3.4) analysis was implemented to explore how local haplotypes were grouped into subpopulations, and if possible to visualise changes in the frequency of the defined subpopulations over time. This technique employs a Bayesian approach to establish the probability of the number of populations in a sample of sequences. The analysis was carried out for 50,000 iterations, followed by 100,000 Markov Chain Monte Carlo (MCMC), and all runs were based on the model of admixture [47]. Twenty replicates run with a K -value that ranged from two to six predicted the optimum value of K , and the probability $LNP [D / K]$ was calculated [48]. The fixation index (F_{ST}) was determined between parasite subgroups of southern Mexico (defined by time periods) and for parasites from distinct geographic origins using the program DnaSP v5.1.

Homologous sequences of *P. vivax* from different geographic sites were found at NCBI, GenBank: Venezuela (VN7), EU346015–EU346087 [33]; Iran (IR) JF682785–JF682790 (Unpublished), JX624732–JX624760 [32]; Sri Lanka (SLK), EF218679–EF218701 [28], India (IND) EU282774–EU282822 [29], EF025187–EF025197 [49]; Papua New Guinea (PNG), KC702458, KC702402–KC702503 [22]; Thailand (TH1) FJ784891–FJ785121 [30] and South Korea (SK) KM230319–KM230384 [31].

Results

Plasmodium vivax ama1_{I-II} from southern Mexico, 1993–2011

Polymorphism and MGI

One hundred and seventy-eight *pvama1_{I-II}* sequences comprising a fragment of 702 bp were obtained from 176 parasite isolates; eighty-four percent ($n = 89$) of whole blood samples (period 2002–2011), and only

47.5% ($n = 87$) of blood impregnated onto filter paper. The *pvama1_{I-II}* gene fragment was obtained from all samples from 1995 ($n = 8$) but none of the samples from 1996 ($n = 4$). For other years the proportion of samples with a high-quality sequence varied between 17 and 58%. Failure to amplify parasite DNA or to obtain a good quality sequence could be due to low parasitemia, and the quality of DNA preserved onto filter paper.

The electropherograms suggested only one haplotype (assigned as a single genotype infection) for 158 isolates, while 18 samples (10.33%) had more than one peak in at least one nucleotide position (suggesting more than one genotype per sample). The samples were re-sequenced and electropherograms reviewed by three examiners. The cloning resolved only for two samples, two haplotypes per each sample.

Thirty-five previously reported sequences (KP759815–KP759849) from 2006 and 2007 [36] were included in the analysis, which made 213 sequences.

Genetic diversity

The 16 polymorphic sites were dimorphic. There were ten changes in the DI domain and six in the DII domain (Additional file 1: Table S1). The whole gene fragment (DI-DII) resolved fifteen haplotypes (H1-H15). Only one nucleotide change existed between H1 and H7, and one between H8 and H11. Haplotype H7 was also present in a single genotype infection. Seven polymorphisms were exclusive to southern Mexico, as previously described [36], and only two other nucleotide changes were detected in a single parasite from 2010 (T583A and A911G). Eight of 15 haplotypes were exclusive for southern Mexico (H1, H4, H7, H8, H9, H10, H14 and H15) (Additional file 2: Figure S1). At least one of the other haplotypes was previously reported in Venezuela [33], Iran [32], India [29, 49], Sri Lanka [28], Thailand [30] or South Korea [31] (see also Additional file 2: Figure S1).

For *pvama1_{I-II}* in southern Mexico, the overall nucleotide (π) and genetic diversity (θ) were low, being 0.0067 ± 0.0002 and 0.0038 ± 0.0009 , respectively. These values are similar to those reported for a sample of 35 parasites from 2006–2007 [36], and above those calculated for parasites from Venezuela [33] or South Korea [31], both sites of low transmission [2]. Other geographic sites with high transmission had greater genetic diversity (0.0073–0.0101), including Iran [32], India [29, 49], Sri Lanka [28], PNG [22] and Thailand [30] (Additional file 3: Table S2). Parasites from southern Mexico had the lowest haplotype diversity (0.734), with their R_m value being similar to that found in parasites from Venezuela and South Korea (Additional file 3: Table S2).

Natural selection

The $dN - dS$ value was positive (1.527; $P > 0.05$) for southern Mexico, as it was at the global level (0.806), in neither case reaching significance. There were similar values for other geographic sites, except SLK (2.154, $P < 0.05$). However, the McDonald-Kreitman test was positive and highly significant at the global and local level for all geographic sites herein analysed (Table 1).

Linkage disequilibrium

The LD coefficient R^2 for southern Mexican parasites (0.5103) was moderate (Additional file 3: Table S2) compared to the elevated values at sites with the low transmission. Contrarily, R^2 was low at sites showing high transmission.

F_{ST} values

Plasmodium vivax from distinct geographical origins had from moderate to high values. Southern Mexican parasites had F_{ST} values from 0.1267 to 0.4601 when compared to other regions. Between southern Mexico or Venezuela and Iran, moderate F_{ST} values of 0.1267 and 0.1605 were obtained. Between southern Mexico and Venezuela, the value was higher ($F_{ST} = 0.2251$, $P < 0.001$). The greatest F_{ST} values were between South Korea and other sites (0.3654 to 0.6054). Moreover, F_{ST} values between Iran, India and Sri Lanka were close to zero (Additional file 4: Table S3).

Temporal genetic analysis of *P. vivax ama1_{I-II}*

The number of sequences obtained per year varied from two to nineteen. Figure 1 shows the proportion of each haplotype found per year. There were important changes in haplotype frequency. For example, H8 was at a proportion of 0.667 in 2007, followed by its reduction to 0.158 in 2008. Contrarily, H1 increased to predominate in 2008 and 2009. In 2002, H5 was present at a higher frequency than H1 and H8. These sequences were grouped into six consecutive 3-year time periods, each including a minimum of 20 sequences: 1993–1995 ($n = 21$), 1997–1999 ($n = 23$), 2000–2002 ($n = 22$), 2003–2005 ($n = 52$), 2006–2008 ($n = 54$) and 2009–2011 ($n = 41$).

The highest proportion of samples presumably carrying mixed genotype infections (MGI) was determined for 1993–1995 and 1997–1999, resulting in a value of 23.1 and 47.8%, respectively. The percentage of mixed genotype infections dropped to 4.5 and 2.4% for 2000–2002 and 2009–2011, respectively. In only two cases, the cloning resolved two haplotypes per sample: sample number 8998 included haplotypes H1 and H7, and sample number 2500 had H8 and H11. For another 12 isolates, only one haplotype per sample was resolved, while four other isolates were not possible to clone.

Table 1 Natural selection tests on *Pvama1a* among *P. vivax* populations of different geographic origins

Country	Polymorphic changes within <i>P. vivax</i> populations		P value ^a	Fixed changes between species ^b	McDonald-Kreitman (M)		Fisher's exact test (P-value)	
	Synonymous	Nonsynonymous			Synonymous	Nonsynonymous		
SMX	1	15	1.510	0.3	53	25	31,800	< 0.000001
VN7	2	9	0.821	0.41	54	28	8,679	0.00591
IR	4	24	0.894	0.40	51	24	12,750	< 0.000001
SLK	2	21	2.154	0.03	53	24	23,188	< 0.000001
IND	7	23	1.012	0.31	53	24	7,253	0.00002
PNG	4	15	1.725	0.09	51	24	12,750	0.00001
THL	7	19	-0.071	0.94	50	21	6,333	0.00002
SK	10	16	-0.475	0.67	51	25	3,264	0.01934
Total	20	41	0.836	0.40	45	20	4,950	0.00002

^adM-dS, the difference between the rate of nonsynonymous and synonymous mutations

^b*Plasmodium cynomolgi* was used as the outgroup species (GenBank: X66039.1)

Abbreviations: *M* Neutrality Index (significance at 95%), *SMX* southern Mexico, *VEN* Venezuela, *IR* Iran, *SLK* Sri Lanka, *IND* India, *PNG* Papua New Guinea, *THL* Thailand, *SK* South Korea

The genetic parameters varied over time. In the samples from 1993–1995, the nucleotide diversity was the lowest ($\pi = 0.00526$). Then in the 1996–1999 period there was an increase in this π value (0.00758) (Fig. 2a), which coincided with the significant rise in malaria cases from 1998 to 2000 (Fig. 2d), likely as the result of the climatic event “El Niño”. Subsequently, a reduction in both malaria cases and genetic diversity took place

during 2000–2002, followed by a greater decline in malaria cases (although genetic diversity is remaining the same) during 2003–2005. Despite the rise in malaria cases during 2006–2008, the nucleotide diversity (π) continued to diminish through the 2009–2011 period (0.00591 + 0.00002). The theta value was consistently much lower than pi. In contrast, the LD index R^2 underwent a gradual increase from 0.4886 to 0.9614 (Fig. 2b).

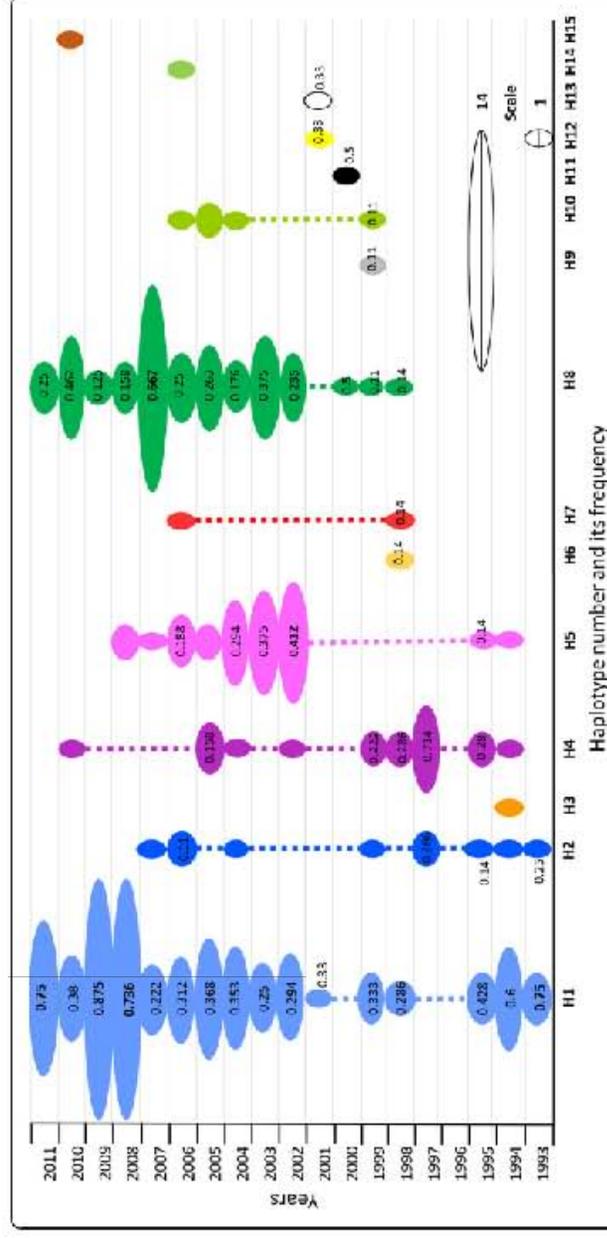
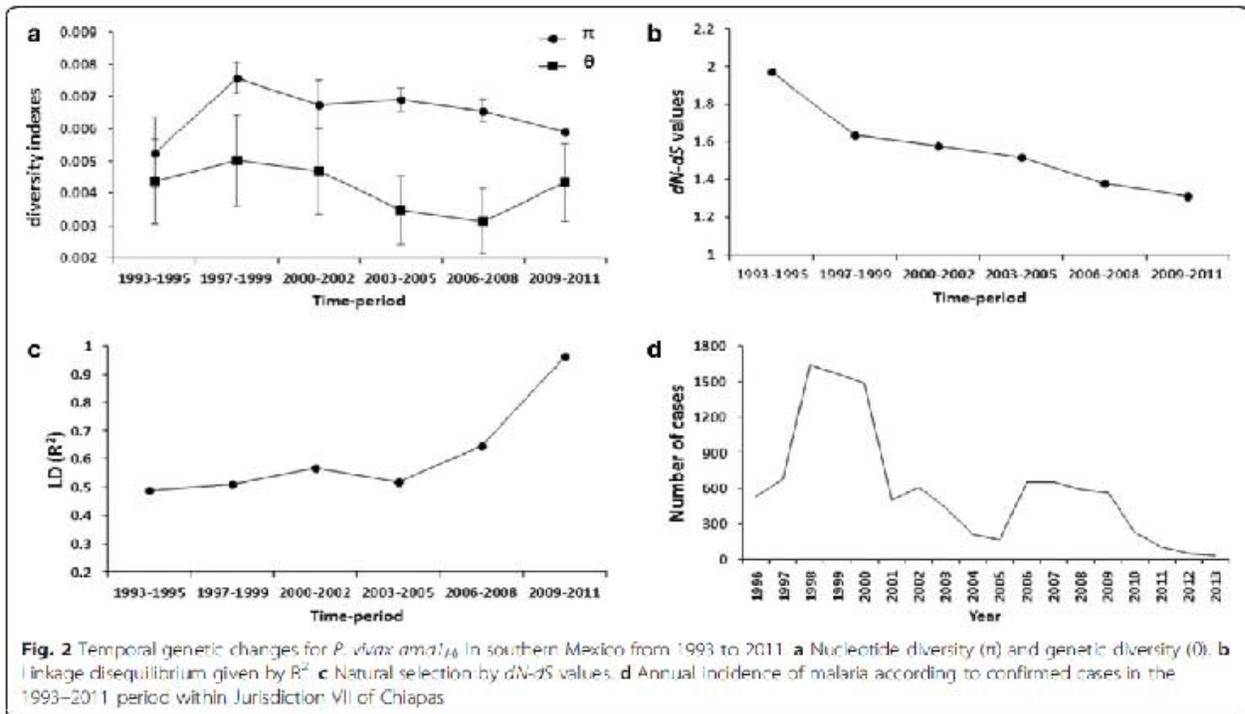


Fig. 1 Yearly distribution of *Pvama1a* haplotypes in southern Mexico during 19 years. Of 213 DNA sequences, 15 haplotypes were resolved (denominated H1–H15). The proportion of each haplotype in each year is represented by the size of the oval (only those representing ≥ 0.10 are indicated). Some haplotypes were highly frequent in a particular period and existed in samples collected from different years. There were variations in haplotype frequency. It is possible that certain haplotypes alternated with one another. For instance, H1 was present for almost the entire study, having an increased frequency during 2008–2009 and in 2011. This haplotype seemed to alternate with H8, which had a greater proportion in 2007 and in 2010. No samples from 1996 were tested



The $dN - dS$ value was positive and gradually decreased from 1.971 to 1.313, but was not significant (Fig. 2c). Figure 2d shows the number of confirmed malaria cases per year, compiled by the Sanitary Jurisdiction VII in the State of Chiapas, Mexico. The number of cases was high during 1998–2000, and then a sudden drop was registered. A second peak was observed in the 2006–2009 period, followed by a sustained decline after that. In this Jurisdiction, only 101 malaria cases were reported in 2011.

Haplotype networks and temporal changes in *pvama111* allelic frequencies

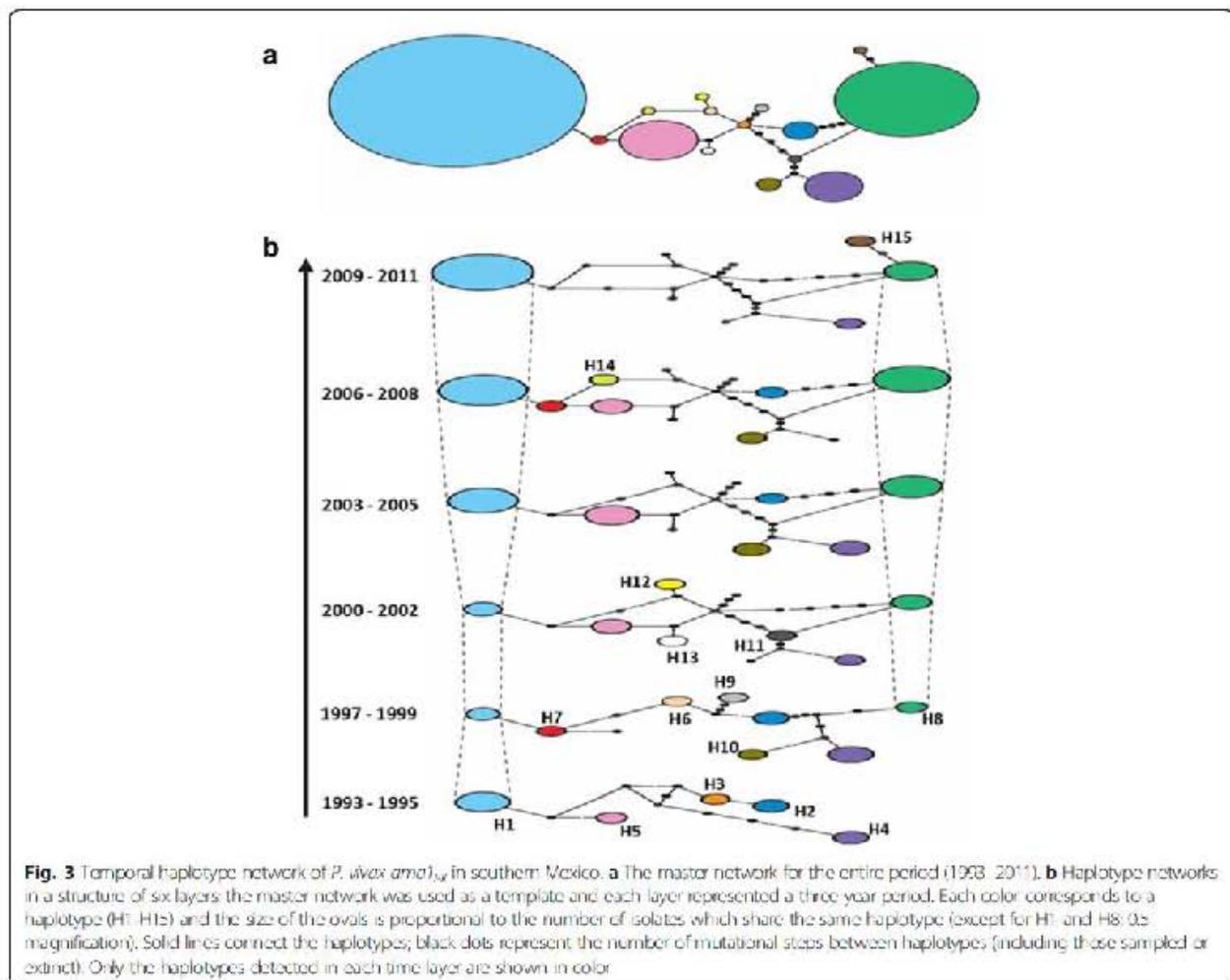
The master network showed that the 15 haplotypes from southern Mexico were separated by one to twelve mutational steps, and two sampled haplotypes by one to four mutational steps. The most frequent haplotypes, H1 and H8 at 42.9 and 24%, respectively, were highly divergent, being separated by at least nine mutational steps. Haplotype H1 was two mutational steps from H5 (13.6%) and two to eleven mutational steps from other low-frequency haplotypes (mostly detected in a single isolate). On the other hand, H8 was four mutational steps from H2 (4.2%) and H4 (8.5%), and two mutational steps from H15, which was found in a single isolate. The network also revealed two loops, suggesting recombination events between haplotypes H2, H3, H8 and H11, as

well as between haplotypes H13, H15, H16, H17 and H14 (Fig. 3a).

Seven of 15 *pvama111* haplotypes (46.7%) were present in more than one period. Another eight haplotypes were unique, and six of these were observed from 1998 to 2001, the period with the maximum number of reported malaria cases (Fig. 3b). There were five divergent haplotypes (H2, H4, H5, H7 and H10) from the beginning to the end of the study. Though H8 was abundant from 2002 on, it was not encountered in the samples during 1993–1995. Haplotype H5, closely related to H1 and H7 and detected in the 1993–1995 period, was not found immediately after the climactic event “El Niño” (1997–2001) but was very frequently observed from 2002 to 2008. H2 and H4, which were separated from H8 by five mutational steps and from each other by nine mutational steps, had similar distribution overtime. Based on the haplotype network for global parasites, with 104 varieties, southern Mexico has three lineages that are closely related to haplotypes from Venezuela, India, Iran and South Korea (Additional file 2: Figure S1).

Structure analysis

The 15 haplotypes from southern Mexico were grouped into three subpopulations (P1, P2 and P3) (Fig. 4a). P2 comprised ~ 57%, followed by P3 at ~ 24% and P1 at ~



10.8%. P2, which included haplotype H1, was the most abundant and widely distributed subpopulation over time. P3 was present from 1997 to 2011. The frequency of P1 fluctuated greatly, and was the only one to undergo a drastic reduction. Its ~50% frequency in the 90's fell to ~30% during 2003–2005 and then dropped sharply to ~4% in the 2006–2008 and 2009–2011 periods. In the 1990s, interestingly, P1 and P2 were the two most frequent populations (Fig. 4b). About 8% of individuals showed mixed ancestry. One mixed type consisted of P2 and P3 ancestry and was found in several, which were more frequent from 1993 to 1999 (Fig. 4c). A moderate structure was determined in Mexico compared to the global level (Additional file 5: Figure S2).

The highest F_{ST} values were detected between 1993–1995 and 1997–1999, and between 1997–1999 and 2000–2011 ($F_{ST} = 0.167$ and 0.153, respectively;

$P < 0.01$ in both cases). The sample size was similar during these periods (Table 2).

Discussion

Due to its significant reduction in malaria cases, Mexico entered the pre-elimination phase in 2009 [50]. One of the most affected areas is Southern Mexico, a region sharing a border with Central America. The complex malaria epidemiology of this region is illustrated in the current study. For 19 years (1993–2011), the increases and decreases in *P. vivax* cases were accompanied by changes in the parameters of population genetics. The gradual reduction in *P. vivax* cases after 1999–2000 went with a reduction in the genetic diversity and the rate of mixed genotype infections, as well as an increase in linkage disequilibrium, alterations in the haplotype and subpopulation frequency, and variations in natural selection.

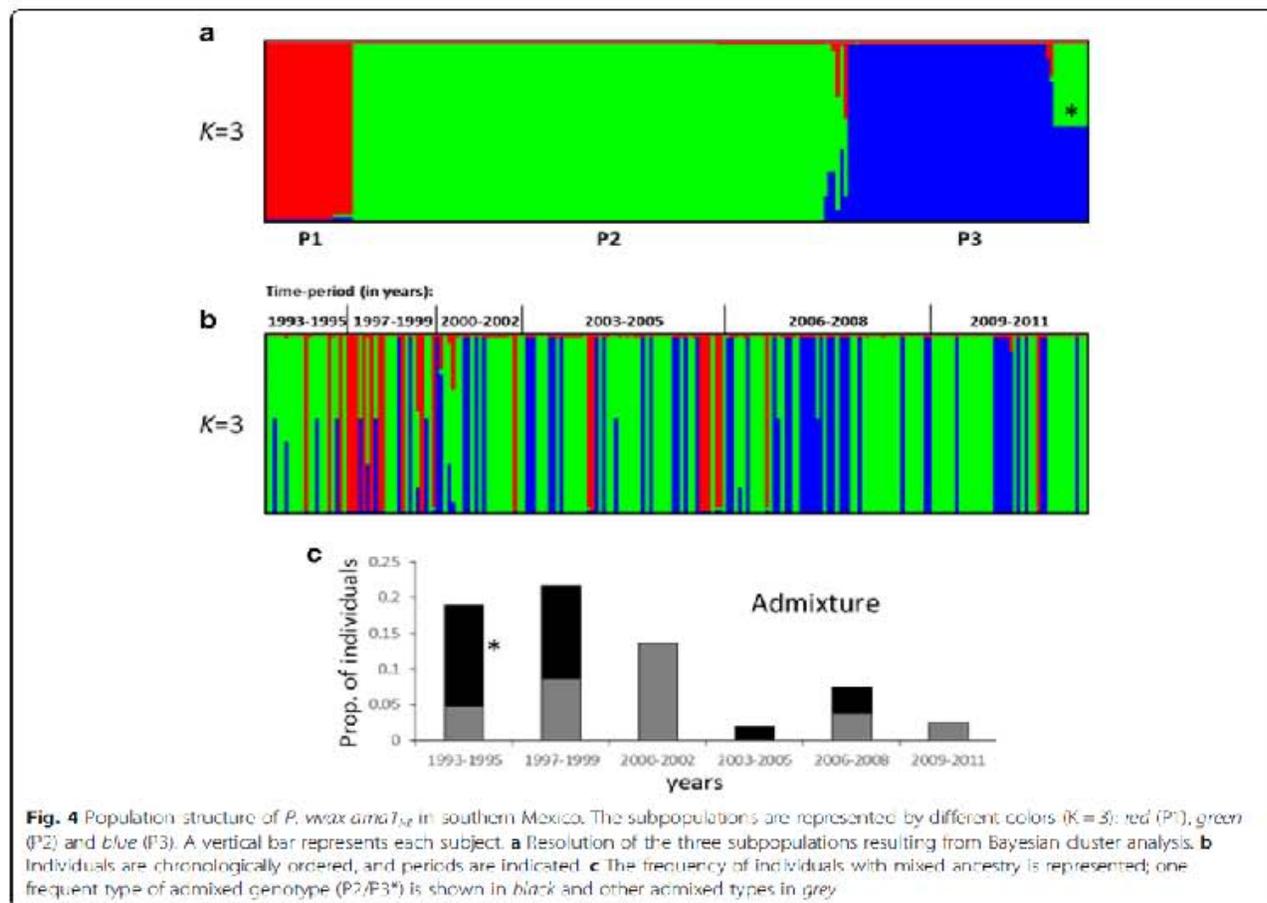


Fig. 4 Population structure of *P. vivax am1L* in southern Mexico. The subpopulations are represented by different colors ($K=3$): red (P1), green (P2) and blue (P3). A vertical bar represents each subject. **a** Resolution of the three subpopulations resulting from Bayesian cluster analysis. **b** Individuals are chronologically ordered, and periods are indicated. **c** The frequency of individuals with mixed ancestry is represented; one frequent type of admixed genotype (P2/P3*) is shown in black and other admixed types in grey

The 213 *P. vivax* sequences detected over 19 years represented a much higher number of *pvama1L* haplotypes than that found in each of the three-year periods. Additionally, the most frequent haplotypes were present either during all or most of the study. In the majority of cases, the genetic diversity varied over time and coincided with the fluctuations in malaria cases. The greatest number of haplotypes and the highest genetic diversity ($\pi = 0.00258$), observed during 1997–1999, but the period of pre-elimination (2009–2011) witnessed the second lowest diversity ($\pi = 0.00591$) in a subgroup, and

this was based on a comparable or higher number of samples than those from previous years, which indicates that this reduced value is very likely to be accurate. These results suggest that the effective population size of *P. vivax* was relatively small in southern Mexico. A previous study using microsatellites also showed that changes in the annual number of cases were accompanied by modifications in the nucleotide diversity [51].

The current study was conducted with only a few samples per year, as the focus was on the trends rather than yearly changes. The rise in malaria cases during

Table 2 F_{ST} values based on *ama1L* between *P. vivax* populations defined by 3-year periods in southern Mexico

Time period:	1993-1995	1997-1999	2000-2002	2003-2005	2006-2008
1997-1999	0.1677				
2000-2002	0.0203*	0.0556**			
2003-2005	0.0580**	0.0427***	-0.0242		
2006-2008	0.0609**	0.0867***	0.0027	0.0065	
2009-2011	0.0223**	0.1530***	0.0381***	0.0439***	0.0108

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

2006–2009 seemed not to affect the nucleotide diversity, this being similar to the previous period (2003–2005). Moreover, no genetic difference between the parasites from these two periods was suggested by the F_{ST} value, meaning that parasite structure was little affected.

The differentiation values can increase due to the divergence of the remaining parasites (as suggested by Volkman) [52], in regions entering the elimination phase [7], or in periods of re-emergence [13]. It was herein observed that the pre-elimination parasites were highly differentiated from parasites of uppermost transmission (1997–1999).

The detection of multiple genotype infections (MGIs) in regions with various levels of *P. vivax* transmission is common, but its rate rises in a high transmission setting [53]. In this study, there was a low-moderate proportion of MGIs and admixture (based on *pvama1*), as reported previously when using microsatellites in southern Mexico [12]. During the control phase (especially between 1993 and 1999), either MGIs or admixture rates were higher than in the elimination phase, the latter being a time when the number of MGIs and samples with admixture became negligible. This coincides with the extremely high linkage disequilibrium present in this phase.

Though the MGI rate was the greatest during the control phase, the presence of several haplotypes over time suggest that clonal transmission of *P. vivax* has been occurring in southern Mexico. The differential mosquito susceptibility to *P. vivax* strains and the geographic isolation of certain strains [12, 34] might have reduced the chances of recombination between divergent haplotypes in the region. If recombination occurred, it was between identical or very closely related genotypes, as reported by others [54]. The clonal transmission of human *Plasmodium* species occurs in both high [7, 20] and low transmission settings, the latter observed in Korea when using *pvmSP1* and *pvcSP* [55] and in Brazil with *P. falciparum* when employing *msp1* and *msp2* [56, 57].

After malaria was re-introduced in Korea, the increase in genetic diversity was the result of parasite migrations rather than the generation of new hybrid parasites [13]. Although southern Mexico shares a border with Central America, and human migration flows from South/Central to North America, the introduction of new divergent parasites was not herein demonstrated. Like Central America, the circumsporozoite vk210 and vk247 genotypes have been detected since the early 1990s in southern Mexico [58]. Consequently, the haplotype networks suggest that *P. vivax ama1_{1, n}* haplotypes are closely related and have recently expanded due to local adaptations [12]. This idea is supported by previous findings with *msp1* icb5-6 [35] and more recently with the genomic SNP analysis revealing that parasites from southern Mexico have recent

common ancestry [59]. Such adapted, highly frequent and persistent haplotypes that are exclusive to southern Mexico might have spread as a consequence of climatic events that impeded access to communities, either by roads or rivers, thus creating impediments to the delivery of control measures.

Genes coding for diverse antigens (e.g. *pvama1*) are present in many low-frequency haplotypes that fluctuate by genetic drift, especially in populations facing a drastic demographic reduction. It cannot be ruled out that haplotypes coming from relapse cases may influence the observed changes in allele frequencies. Hypnozoite genetic reservoirs contribute to maintaining the malaria genetic pool over time [60]. Up to 1998 in southern Mexico, *P. vivax* was treated for five days with primaquine [61], which is not highly effective in preventing relapse episodes [62]. Subsequently, intermittent single doses administered to confirmed cases [60] did not avoid symptomatic and asymptomatic relapse episodes [33, 36]. In addition, gametocytes were harvested from most *P. vivax* infected samples (primary and relapse infections) [51, 63]. Another factor involved in the local development of *P. vivax* strains is the influence of climatic events, such as “El Niño” and Hurricane Stan (2005), which might have contributed to the resilience of malaria transmission despite control measures. The reports on the number of malaria cases suggest that it took about three and four years to get malaria back to a downward trend after each of these events.

Although there was a reduced haplotype pool in the pre-elimination phase, the most divergent haplotypes representing the three *P. vivax* lineages or subpopulations persisted. The yearly frequencies of *P. vivax* haplotypes underwent expansion and alternation, and the latter case was more notorious among more frequent and divergent haplotypes (e.g. H11 vs H8, H4 or H5). This information may be relevant for vaccine development.

There is evidence that balancing selection has maintained the polymorphism of *pvama1_{1, n}* [33, 36]. The haplotype alternation herein observed could have been induced by specific antibody responses [64]. It is interesting that $dN - dS$ values decreased along with the decline in the number of malaria cases. Perhaps the reduction in immune individuals diminished selective pressure. Robust evidence exists that antibodies against PvAMA1 can inhibit the invasion of parasites into reticulocytes of human hosts [65, 66], and that antibody response to PvAMA1 are naturally acquired by human populations in distinct endemic regions. The influence of the antibody response has been reported in South America [67–69], the Mideast [69] and the Indian subcontinent [70, 71]. However, this does not explain the steady decrease in $dN - dS$

values when malaria cases were most numerous, during 1997–1999 and 2006–2008.

Conclusion

In summary, anti-malarial actions have rendered a gradual reduction in the number malaria cases and caused alterations in the genetic structure of the parasite in the hypodemic region of southern Mexico, despite the fluctuations in these parameters caused by climactic events and parasite and vector characteristics. Hence, parasite elimination from the region might be possible in the near future.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Polymorphism and haplotypes defined for *P. vivax* *ama1*₁₋₅ in southern Mexican parasites. Sixteen variable sites were detected, and 15 haplotypes (I1-I15) were resolved. (DOCX 21 kb)

Additional file 2: Figure S1. Global haplotype network of *pvama1*₁₋₅. Each circle corresponds to a haplotype (104 haplotypes) and each color represent the parasite origin, the size of the circle is proportional to the number of isolates that share the same haplotype. Single haplotypes were not considered. Solid lines connect the haplotypes, while short and perpendicular lines on the solid lines represent the number of mutational steps between two haplotypes. Small black circles indicate haplotypes not sampled or extinct. (PDF 144 kb)

Additional file 3: Table S2. Parameters of genetic diversity and recombination for *pvama1*₁₋₅ in parasite populations of different geographic origin. (DOCX 24 kb)

Additional file 4: Table S3. F_{ST} values between *P. vivax* populations of different geographic origin. (DOCX 23 kb)

Additional file 5: Figure S2. Population structure of *P. vivax* based on *pvama1*₁₋₅. Colors (red, blue and green) represent the resulting populations ($K=3$) from Bayesian clustering analysis. A vertical bar represents each individual. (PDF 197 kb)

Abbreviations

MGi: Mixed genotype infections; *pvama1*₁₋₅: *P. vivax* apical membrane antigen 1 gene domains I and II

Acknowledgements

Alejandro Flores-Alanis is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 347268 from CONACYT. Thanks to Olga I. Palomeque at the Regional Center for Research in Public Health in Mexico for her technical assistance.

Funding

This work was funded by CONACYT-Mexico project CB-2009-01-131247.

Availability of data and material

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article and its additional files. The DNA sequences and the data related were deposited in the GenBank database with accession numbers KY094724–KY094901.

Authors' contributions

AFA, run molecular techniques, analysis of data and its interpretation, drafted the manuscript. LGC and TC, participated in study design, data analysis and interpretation, and were major contributors in writing the manuscript. CX, drafted the manuscript. FSV and MAS, performed molecular techniques. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Ethical Committee of the National Institute of Public Health in Mexico (INSPI). *P. vivax* Blood samples had been obtained from patients living in the southern Chiapas, Mexico.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹División de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico. ²Centro Regional de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud Pública, Tapachula, Chiapas 30700, Mexico. ³Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 06729, Mexico.

Received: 3 December 2016 Accepted: 25 April 2017

Published online: 02 May 2017

References

- Guerra CA, Howes RE, Patil AP, Gething FW, Van Renswoude TP, Temperley WH, et al. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(8):e774.
- WHO. World Malaria Report 2015. Geneva: World Health Organization; 2015. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/en/>. Accessed 16 April 2017.
- Mexican Ministry of Health: Epidemiological bulletin. http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/cigaeb/boletin/indic_boletin.html (2014). Accessed 16 April 2017.
- PAHO. Interactive Malaria Statistics. Washington: Pan American Health Organization; 2014. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=26329&Itemid=2130&lang=en. Accessed 16 Apr 2017.
- Janse CJ, van der Klooster PE, van der Kaay HJ, van der Ploeg M, Overduin SA. DNA synthesis in *Plasmodium falciparum* during asexual and sexual development. *Mol Biochem Parasitol*. 1986;20(2):173–82.
- Neafsey DE, Galinsky K, Jiang RH, Young L, Bykes SM, Sciff S, et al. The malaria parasite *Plasmodium vivax* exhibits greater genetic diversity than *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet*. 2012;44(9):1046–50.
- Koepfli C, Rodrigues PI, Antao T, Orjuela Sánchez P, Van den Bede P, Gamboa D, et al. *Plasmodium vivax* diversity and population structure across four continents. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(6):e0003872.
- Chevillon C, de Meeds T, McCoy KD. Population Genetics and Molecular Epidemiology of Infectious Diseases. In: Morand S, Beaucloux F, Cabaret J, editors. *New Frontiers of Molecular Epidemiology of Infectious Diseases*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. p. 45–76.
- Meirmans PG. The trouble with isolation by distance. *Mol Ecol*. 2012;21(17):2839–46.
- Travis J. The interplay of population dynamics and the evolutionary process. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1996;350(1257):253–9.
- Carlton JM, Das A, Escarante AA. Genomics, population genetics and evolutionary history of *Plasmodium vivax*. *Adv Parasitol*. 2013;81:203–22.
- Joy DA, Gonzalez Cerón L, Carlton JM, Gueyes A, Fuy M, McCullochan JF, et al. Local adaptation and vector-mediated population structure in *Plasmodium vivax* malaria. *Mol Biol Evol*. 2008;25(9):1745–57.
- Iwagami M, Hwang S Y, Kim S H, Park S J, Lee G Y, Matsumoto Takahashi EA, et al. Microsatellite DNA analysis revealed a drastic genetic change of *Plasmodium vivax* population in the Republic of Korea during 2002 and 2003. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(10):e2572.
- Batista CL, Barbosa S, Da Silva BM, Viana SA, Ferreira MU. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* over time and space: a community-based study in rural Amazonia. *Parasitology*. 2011;142(2):571–81.
- Dalgaard Ratto C, Soto Calle VE, Van den Bede P, Gamboa D, Rojas A, Abadín FN, et al. Population structure and spatio-temporal transmission dynamics

- of *Plasmodium vivax* after radical cure treatment in a rural village of the Peruvian Amazon. *Malar J*. 2014;13:8.
16. Cullen R, Coban C, Zeyrek FY, Cravo P, Keneko A, Randrianariveloisoa M, et al. The origin of African *Plasmodium vivax*: insights from mitochondrial genome sequencing. *PLoS One*. 2011;6(12):e29137.
 17. Miao M, Yang Z, Fitch H, Huang Y, Escalante AA, Cui L. *Plasmodium vivax* populations revisited: mitochondrial genomes of temperate strains in Asia suggest ancient population expansion. *BMC Evol Biol*. 2012;12:222.
 18. Taylor JE, Pacheco MA, Bacon DJ, Beg MA, Machado RL, Fairhurst RM, et al. The evolutionary history of *Plasmodium vivax* as inferred from mitochondrial genomes: Parasite genetic diversity in the Americas. *Mol Biol Evol*. 2013;30(9):2050–64.
 19. Pacheco MA, Poe AC, Collins WC, Lai AA, Tanabe K, Karuik SK, et al. A comparative study of the genetic diversity of the 42 kDa fragment of the merozoite surface protein 1 in *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Infect Genet Evol*. 2007;7(2):180–7.
 20. Chenet SM, Tapia LL, Escalante AA, Durand S, Lucas C, Bacon DJ. Genetic diversity and population structure of genes encoding vaccine candidate antigens of *Plasmodium vivax*. *Malar J*. 2012;11:68.
 21. Ju H, Kang JM, Moon SJ, Kim JY, Lee HW, Jin K, et al. Genetic polymorphism and natural selection of Duffy binding protein of *Plasmodium vivax* Myanmar isolates. *Malar J*. 2012;11:80.
 22. Arnott A, Mueller I, Ramland PA, Siba PM, Reeder JC, Barry AE. Global population structure of the genes encoding the malarial vaccine candidate, *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 (PvAMA1). *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(10):e2505.
 23. Bary AF, Walzmann A, Koepfli C, Ramadas C, Mueller I. Uncovering the transmission dynamics of *Plasmodium vivax* using population genetics. *Pathogens and Global Health*. 2015;10(9):142–52.
 24. Cowman AT, Bery D, Baum J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J Cell Biol*. 2012;198(6):961–71.
 25. Biglar DJ, Richard D, Wilson DW, Boyle MJ, Dekiwadia C, Turnbull L, et al. Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Cell Host Microbe*. 2011;9(1):9–20.
 26. Hodder AN, Crewther PE, Mathew ML, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, et al. The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. *J Biol Chem*. 1996;271(16):29416–57.
 27. Pizarro J, Normand BV L, Christie Sedek M L, Collins CB, Withers Martinez C, Hockett F, et al. Crystal structure of the malarial vaccine candidate apical membrane antigen 1. *Science*. 2005;300(5720):408–11.
 28. Gunasekera AM, Wikramarachchi I, Nealesey DE, Ganguli I, Perera L, Premaratne PH, et al. Genetic diversity and selection at the *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 (PvAMA1) locus in a Sri Lankan population. *Mol Biol Evol*. 2007;24(1):939–47.
 29. Thakur A, Alam MT, Rana H, Kaur P, Sharma YD. *Plasmodium vivax*: Sequence polymorphism and effect of natural selection at apical membrane antigen 1 (PvAMA1) among Indian population. *Gene*. 2008;419(1–2):35–42.
 30. Putaporntip C, Jongwutwises S, Grynberg P, Cui L, Hughes AL. Nucleotide sequence polymorphism at the apical membrane antigen-1 locus reveals population history of *Plasmodium vivax* in Thailand. *Infect Genet Evol*. 2009; 9(5):1295–300.
 31. Kang JM, Lee J, Cho PY, Moon SJ, Ju HJ, Ahn SK, et al. Population genetic structure and natural selection of apical membrane antigen 1 in *Plasmodium vivax* Korean isolates. *Malar J*. 2015;14(1):455.
 32. Zakeri S, Sadeghi J, Mehrizi AA, Djalic ND. Population genetic structure and polymorphism analysis of gene encoding apical membrane antigen 1 (AMA1) of Iranian *Plasmodium vivax* wild isolates. *Acta Trop*. 2013;126(3):269–79.
 33. Ord R, Tami A, Sutherland CJ. *Amal* genes of sympatric *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* from Venezuela differ significantly in genetic diversity and recombination frequency. *PLoS One*. 2008;3(10):e3366.
 34. González-Cerón L, Alvarado-Dejgado A, Martínez-Barmette J, Rodríguez MH, Cvilla Muñoz M, Pérez F, et al. Sequence variation of ookinete surface proteins Pvs25 and Pvs28 of *Plasmodium vivax* isolates from southern Mexico and their association to local anophelines infectivity. *Infect Genet Evol*. 2010;10(5):645–54.
 35. Cerritos R, González-Cerón L, Nietel JA, Wegler A. Genetic structure of *Plasmodium vivax* using the merozoite surface protein 1 i1c5 6 fragment reveals new hybrid haplotypes in southern Mexico. *Malar J*. 2014;13:5.
 36. González-Cerón L, Cerritos R, Corzo-Mancilla J, Santillán F. Diversity and evolutionary genetics of the three major *Plasmodium vivax* merozoite genes participating in reticulocyte invasion in southern Mexico. *Parasit Vectors*. 2015;8(1):651.
 37. González-Cerón L, Rodríguez MH, White RA, Sina BJ, Polomeque OL, Nietel JA, et al. *Plasmodium vivax*: a monoclonal antibody recognized a circumsporozoite protein precursor on the sporozoite surface. *Exp Parasitol*. 1998;90(3):203–11.
 38. Rodríguez MH, González-Cerón L, Hernández JF, Nietel JA, Villamil C, Kain KL, et al. Different prevalences of *Plasmodium vivax* phenotypes VK210 and VK247 associated with the distribution of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* in Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 2000;62(1):122–7.
 39. González-Cerón L, Martínez-Barmette J, Montero-Solis C, Santillán F, Soto AM, Rodríguez ML, et al. Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax* in Latin America: polymorphism and evolutionary relationships of the circumsporozoite gene. *Malar J*. 2013;12:243.
 40. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22(22):4673–80.
 41. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;30(12):2725–9.
 42. Muse SV, Gao B. A likelihood approach for comparing synonymous and nonsynonymous nucleotide substitution rates, with application to the chloroplast genome. *Mol Biol Evol*. 1994;11(5):715–24.
 43. Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol*. 1981;17(6):368–75.
 44. McDonald IH, Kreitman M. Adaptive protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila*. *Nature*. 1991;351(6320):652–4.
 45. Dutta S, Malhotra P, Chaudhri VS. Sequence analysis of apical membrane antigen 1 (AMA-1) of *Plasmodium cynomolgi bastianelli*. *Mol Biochem Parasitol*. 1995;73(1–2):267–70.
 46. Templeton AR, Sing CF. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics*. 1993;134(2):699–69.
 47. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;157(2):945–59.
 48. Earl DA, VonHoldt BM. Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method - Technical Note. *Conserv Genet Resour*. 2012;4(2):359–61.
 49. Rajesh V, Elamrani M, Vidya S, Gowrishankar M, Koulia D, Das A. *Plasmodium vivax*: Genetic diversity of the apical membrane antigen-1 (AMA 1) in isolates from India. *Exp Parasitol*. 2007;116(3):252–6.
 50. WHO. World Malaria Report 2016. Geneva: World Health Organization; 2016. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>. Accessed 16 April 2017.
 51. González-Cerón L, Mui J, Santillán F, Joy D, Sandoval MA, Camus G, et al. Molecular and epidemiological characterization of *Plasmodium vivax* recurrent infections in southern Mexico. *Parasit Vectors*. 2013;16:109.
 52. Volkman SK, Neafsey DE, Schaffner SF, Park D, With DE. Harnessing genomics and genome biology to understand malaria biology. *Nat Rev Genet*. 2012;13(5):315–28.
 53. Havlyuk T, Ferreira MJ. A closer look at multiple-clone *Plasmodium vivax* infections: detection methods, prevalence and consequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(1):67–73.
 54. Escalante AA, Cornejo OE, Rojas A, Udhayakumar V, Lai AA. Assessing the effect of natural selection in malarial parasites. *Trends Parasitol*. 2004;20(8):388–95.
 55. Choi YK, Choi KM, Park MH, Lee EG, Kim YI, Lee JC, et al. Rapid dissemination of newly introduced *Plasmodium vivax* genotypes in South Korea. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82(3):426–32.
 56. Ferreira MJ, Ribeiro WL, Tonon AP, Kawamoto T, Rich SM. Sequence diversity and evolution of the malarial vaccine candidate merozoite surface protein-1 (MSP-1) of *Plasmodium falciparum*. *Gene*. 2003;304:65–75.
 57. Tonon AP, Hoffmann EH, Siqueira LA, Ribeiro AG, Gonçalves CR, Ribeiro PE, et al. *Plasmodium falciparum*: sequence diversity and antibody recognition of the merozoite surface protein 2 (MSP 2) in Brazilian Amazonia. *Exp Parasitol*. 2004;106(3–4):114–25.

58. Kain KC, Brown AE, Kyle H, Wirtz RA, Joy S, Rodriguez MH, et al. Circumsporozoite genotyping of global isolates of *Plasmodium vivax* from dried blood specimens. *J Clin Microbiol*. 1992;30:1863–6.
59. Hupalo DN, Luo Z, Meinkov A, Sutton PL, Rogov P, Escalante A, Vallejo AF, et al. Population genomics studies identify signatures of global dispersal and drug resistance in *Plasmodium vivax*. *Nat Genet*. 2016;48(8):953–8.
60. Imwong M, Snounou G, Pukrittayakamee S, Tanomsing N, Kim JR, Nandy A, et al. Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from activation of heterologous hypnozoites. *J Infect Dis*. 2007;195(7):927–33.
61. Mexican Ministry of Health: Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2002. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/032ssa202.html> (2002). Accessed 16 April 2017.
62. Gogtay NJ, Desai S, Kamtekar KD, Kadam VS, Dam 5S, Kshirsagar NA. Efficacies of 5- and 14-days primaquine regimens in the prevention of relapses in *Plasmodium vivax* infections. *Ann Trop Med Parasitol*. 1999;93(8):809–12.
63. Gonzalez-Ceron J, Rodriguez MH, Sandoval MA, Santillan E, Galindo-Virgen S, Betanzos AF, et al. Effectiveness of combined chloroquine and primaquine treatment in 14 days versus intermittent single dose regimen, in an open, non-randomized, clinical trial, to eliminate *Plasmodium vivax* in southern Mexico. *Malar J*. 2015;14:426.
64. Bueno LL, Lobo FP, Moraes CG, Mourão LC, de Ávila RA, Soares IS, et al. Identification of a highly antigenic linear B cell epitope within *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1). *PLoS One*. 2011;6(6):e21285.
65. Vicentini EA, Franjoso Ks, Rocha MM, Iourlov D, dos Santos HL, Kubrusly FS, et al. Invasion inhibitory antibodies elicited by immunization with *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 expressed in *Hichia pastoris* yeast. *Infect Immun*. 2014;82(3):1296–307.
66. Arévalo-Herrera M, Chirris C, Herrera S. Current status of *Plasmodium vivax* vaccine. *Vaccines*. 2010;6(1):124–32.
67. Múfalo BC, Gentil F, Bargiel DY, Costa FT, Rodrigues MM, Soares IS. *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. *Microbes Infect*. 2008;10(12–13):1266–73.
68. Rodrigues MH, Rodrigues RM, Oliveira TR, Cômodo AN, Rodrigues MM, Kodon CH, et al. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. *Int J Parasitol*. 2005;35(2):185–92.
69. Salevstfar M, Zakeri S, Abouie-Mehrzi A, Mirkhazemi S, Dinparast DN. Evaluation of naturally acquired antibody responses to two variant forms of *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 in individuals living in areas of low and unstable malaria transmission of Iran. *Arch Iran Med*. 2015;18(12):834–43.
70. Seth RK, Bhat AA, Rao DN, Biswas S. Acquired immune response to defined *Plasmodium vivax* antigens in individuals residing in northern India. *Microbes Infect*. 2010;12(3):199–205.
71. Wickramaratne H, Premaratne FH, Perera KJ, Bandara S, Kodon CH, Thomas AW, et al. Natural human antibody responses to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 under low transmission and unstable malaria conditions in Sri Lanka. *Infect Immun*. 2006;74(1):798–801.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



5. Capítulo 2.

La población de *Plasmodium vivax* del sureste de México presenta diferenciación genética alta y contracción demográfica.

Resumen.

La población de *Plasmodium vivax* del sureste de México (SMX) presenta una diversidad genética baja e identidad por descendencia. La población de parásitos de Centroamérica también presenta diversidad genética baja, y además se ha reportado que pasa por una contracción poblacional, pero estos resultados se han atribuido a la falta de una muestra representativa de la región. Por el contrario, la población de parásitos de Suramérica presenta diversidad genética alta y las evidencias demuestran que hay una expansión poblacional, la alta diversidad genética en Suramérica es atribuida a eventos de introducción continuos de diferentes linajes ancestrales, posiblemente provenientes de Europa. Aquí analizamos la estructura poblacional de *P. vivax* en el SMX, y su comparación con poblaciones de otras regiones geográficas. Además, analizamos su demografía histórica durante el periodo 1993-2011 utilizando 510 pb de la región 3' del gen *cox1* de *P. vivax* (*pvcox1₅₁₀*).

Tres polimorfismos fueron detectados entre 193 secuencias del SMX (G1139A, G1295C y T1593A), dos de ellos (G1139A y G1295C) fueron los más frecuentes a nivel global, pero no fueron detectados en las poblaciones de Suramérica y Europa. Los tres polimorfismos detectados en el SMX definieron tres haplotipos, que, a nivel global, fueron relacionados a dos haplotipos ancestrales. Además, un análisis filogenético demostró un clado que agrupó al 88 % de los parásitos del SMX y los valores de F_{ST} fueron altos, indicando que la población del SMX es altamente diferenciada de otras regiones, incluso de las de Centroamérica y Suramérica. Finalmente, los análisis demográficos detectaron una disminución en el tamaño efectivo de la población de *P. vivax* del SMX.

En el presente trabajo detectamos que la diversidad genética de la población de *P. vivax* del SMX fue baja, los resultados también sugieren que hubo una contracción poblacional, posiblemente como resultado de la disminución de casos en la región, además la población resultó altamente diferenciada de otras regiones. Estas observaciones son información valiosa para el mejoramiento de los sistemas de vigilancia epidemiológica molecular y las campañas de control del paludismo a nivel regional.

Palabras clave: *Plasmodium vivax*, sureste de México, *pvcox1*, demografía histórica, diferenciación genética.

Introducción.

La enzima citocromo oxidasa C subunidad 1 (COX1) es una proteína transmembranal que participa en la cadena respiratoria de eucariontes y procariontes. En eucariontes se localiza en la membrana interna de la mitocondria y su función es catalizar la reducción de O₂ para formar agua (Nelson *et al.*, 2001). Al ser un gen mitocondrial presenta una tasa de evolución baja, herencia uniparental, y no recombinación, estas características lo han hecho un buen marcador en la identificación de especies de *Plasmodium* en mosquitos (Echeverry *et al.*,

2017), y en análisis filogeográficos (Yusof *et al.*, 2016) y de diferenciación genética (Loh *et al.*, 2016) de *P. knowlesi*. Por otra parte, se ha utilizado para la detección de *P. vivax* en personas con paludismo (Cunha *et al.*, 2009) y de *P. gallinaceum* en aves (Pattaradilokrat *et al.*, 2015). Las nuevas tecnologías de secuenciación han permitido amplificar el genoma mitocondrial de *P. vivax* de diferentes regiones geográficas (Carlton *et al.*, 2008; Hupalo *et al.*, 2016; Pearson *et al.*, 2016). Las investigaciones con el genoma mitocondrial han permitido inferir las relaciones genealógicas, procesos de diversificación y demografía histórica de las poblaciones del parásito (Jongwutiwes *et al.*, 2005; Mu *et al.*, 2005; Cornejo y Escalante, 2006; Taylor *et al.*, 2013).

Análisis con el genoma mitocondrial de *P. vivax* indican que su origen tuvo lugar en Asia hace 200-300 mil años (Escalante *et al.*, 2005; Mu *et al.*, 2005; Cornejo y Escalante, 2006). ¿Cómo *P. vivax* llegó a América? aun no es del todo claro, pero se ha propuesto la hipótesis de que llegó con los conquistadores europeos. Las evidencias sugieren la introducción a Suramérica de los linajes de *P. vivax* fue por eventos separados y sucesivos, dichos linajes recombinaron, diversificaron y se expandieron localmente, dando como resultado alta diversidad genética (Galabert *et al.*, 2016; Hupalo *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2018). Por el contrario, en Centroamérica se ha reportado diversidad genética baja y contracción poblacional, pero esos resultados podrían ser efecto del reducido número de muestras analizadas (Taylor *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2018).

Estudios de demografía histórica de *P. vivax* en México y la región centroamericana son escasos. Análisis de la genética poblacional de este parásito en el sureste de México han permitido detectar diversidad genética limitada (Cerritos *et al.*, 2014; González-Cerón *et al.*, 2013; González-Cerón *et al.*, 2015; Capítulo 1), estructuración moderada (Joy *et al.*, 2008; Capítulo 1) y alto grado de diferenciación genética respecto a otras poblaciones (González-Cerón *et al.*, 2015; Hupalo *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2017). La detección de los cambios en la diversidad y estructura genética de las poblaciones residuales de *P. vivax* a una escala regional y global es esencial para mejorar los programas de vigilancia epidemiológica molecular. En este estudio analizamos la estructura poblacional de *P. vivax* en el sureste de México, y su comparación con poblaciones de otras regiones geográficas. Además, analizamos su demografía histórica durante el periodo 1993-2011 utilizando 510 pb de la región 3' del gen *cox1* de *P. vivax* (*pvcox1₅₁₀*).

Métodos.

Aislados de *Plasmodium vivax* del sureste de México.

Para este estudio se utilizaron 171 muestras que resultaron ser infecciones monoclonales para los genes *pvmsp1₄₂* y/o *pvama1_{I-II}* durante el periodo 1993-2011 (Capítulo 1).

Amplificación y secuenciación de la región 3' del gen *pvcox1*.

La extracción de ADN de 82 muestras de papel filtro impregnado con sangre y 89 muestras de sangre completa de los años 1993-2011 se hizo utilizando el QIAamp® DNA Blood Mini kit (Quiagen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El número de muestras analizadas por PCR por año se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Número total de muestras analizadas por PCR y secuencias obtenidas del marcador *pvcox1*₅₁₀ por año.

	Muestras analizadas por PCR	Muestras con secuencia
1993	5	4
1994	7	5
1995	4	2
1996	1	0
1997	6	2
1998	4	3
1999	9	6
2000	1	0
2001	4	4*
2002	8	18*
2003	18	18
2004	18	18
2005	20	20
2006	3	17*
2007	1	19*
2008	19	17
2009	18	16
2010	13	12
2011	12	12
Total	171	193

* Secuencias obtenidas previamente: 2001 n=1, 2002 n=10, 2006 n=14 y 2007 n=18 (Espinosa, 2015, datos no publicados, tesis de maestría, INSP).

Un fragmento de 510 pb del gen *cox1* (*pvcox1*₅₁₀) fue amplificado de muestras de sangre completa usando los iniciadores específicos *pvm11_F1* 5' TCC TAC ATT TGC TGG AGA TCC T 3' y *pvm11_R1* 5' GAG AAT TAT GGA GTG GAT GGT G 3' (Espinosa, 2015. Tesis de maestría, INSP) La reacción de PCR consistió en: 1X Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega, Madison, WI), 1.5 mM de MgCl₂ (Promega, Madison, WI), 0.6 mM de dNTPs

(Invitrogen, Carlsbad, CA.), 0.5 μ M de cada iniciador, 1.5 U de GoTaq[®] DNA Polimerasa (Promega, Madison, WI), 1 μ l de ADN y agua para un volumen final de 50 μ l.

Para las muestras de papel filtro se utilizaron los iniciadores específicos *pvm11_F1* y *pvm11_R2* 5' TGA GTT ATT GGG GTG CAA CTG3'. La reacción de PCR fue similar a la de las muestras de sangre completa, excepto por que se utilizó 0.2 mM dNTPs, 1 U de GoTaq[®] DNA Polimerasa, 1-2 μ l de ADN y agua para un volumen final de 20 μ l.

Las condiciones de PCR para ambos casos fueron: desnaturalización a 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos (muestras de sangre completa) o 20 ciclos (muestras de papel filtro) de desnaturalización a 94°C por 40 seg, alineación a 56°C por 30 seg y extensión a 72°C por 1 min; y una extensión final a 72°C por 5 min. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador T100[™] Thermal Cycler (Bio-Rad, CA, USA).

Las muestras amplificadas se procesaron por electroforesis en geles de agarosa al 1 % y el producto amplificado se visualizó con 0.2 μ g/ml de bromuro de etidio bajo luz ultravioleta. Las muestras amplificadas con presencia de una banda única se purificaron y concentraron con el MinElute[®] PCR Purification Kit (Quiagen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR purificados fueron secuenciados en sentido y anti-sentido en Macrogen, Inc. (Geumcheon-qu, Seoul, Rep. Korea).

Las muestras de sangre completa y papel filtro que no alcanzaron una concentración de 30ng/ μ l de ADN para su secuenciación fueron amplificadas por PCR anidado. Se utilizaron los iniciadores específicos *pvm11_F2* (5' TAG GAA GTG TTG TAT GGG CTC 3') y *pvm11_R1*. La reacción de PCR consistió en: 1X Colorless GoTaq[®] Flexi Buffer (Promega, Madison, WI), 1.5 mM de MgCl₂ (Promega, Madison, WI), 0.2 mM de dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, CA.), 0.5 μ M de cada iniciador, 1.5 U de GoTaq[®] DNA Polymerase (Promega, Madison, WI), 3 μ l de una dilución 1:10 del ADN de la primera reacción y agua para un volumen final de 50 μ l. Las condiciones de la PCR fueron las mismas y se utilizaron 35 ciclos.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas se revisaron utilizando el programa *Bio Edit Sequencing Alignment Editor* v5.0.9 (Hall, 1999) y fueron alineadas con *Clustal W* (Thompson *et al.*, 1994) utilizando como referencia las secuencias Salvador I (*Sal-I*) (GenBank: AY791551).

Análisis de secuencias.

Las secuencias obtenidas para el sureste de México se analizaron junto con 791 secuencias homologas de diferentes regiones geográficas disponibles en el GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Anexo 3). Las secuencias se agruparon por regiones: secuencias de este trabajo (sureste de México), muestras de casos importados a los Estados Unidos de América detectados por el Centro para la Prevención y Control de Enfermedades (CDC), con

posible origen en México (MX-CDC; n = 3), Centroamérica (Belice, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá y República Dominicana: CAM; n = 33), Suramérica (Colombia, Venezuela, Brasil, Perú, Ecuador y Guyana Francesa: SAM; n = 181), Europa (muestras de España de los años 1942-1944: EUR; n = 3), África (Madagascar, Mauritania, Nigeria, Sao Tome, Etiopía, Tanzania, Ruanda, Angola, Sudan, Uganda y Namibia: AFR; n = 90), Medio Oriente (Turquía e Irán: MOR; n = 28), Sur de Asia (Afganistán, Pakistán, India, Sri Lanka y Bangladesh: SAS; n = 100), Este de Asia (China y Corea: EAS; n = 125), Sureste de Asia (Myanmar, Tailandia, Camboya, Vietnam, Filipinas, Indonesia, Borneo y Timor del este: SEA; n = 154) y Oceanía (Papúa Nueva Guinea, Islas Salomón y Vanuatu: OCE; n = 74).

Polimorfismos y Diversidad genética. Usando la cepa de referencia *Sal-I* se identificaron las variaciones de nucleótidos en el total de las secuencias. El programa *DnaSP* v5.1 (Librado y Rosaz, 2009) fue utilizado para determinar el número de polimorfismos (S), número de haplotipos (*h*) y la diversidad haplotípica (*Hd*) y nucleotídica (π).

Árbol filogenético. Para obtener el modelo evolutivo, el total de las secuencias fueron analizadas en el programa *jModeltest 2* (Darriba, 2012). Evaluamos 40 modelos de sustitución que asumen frecuencias de bases iguales y desiguales (+F), proporción de sitios invariables (+I) y cuatro categorías de variación entre sitios (+G). La topología óptima se estimó con el algoritmo de máxima verosimilitud (ML). Para el análisis global, el valor más alto del Criterio de Información de Akaike (AIC) fue para el modelo de sustitución TPM_{1f} + I + G. Mientras que para el análisis con las secuencias del SMX el valor más alto del AIC fue para el modelo de sustitución HKY. Estos modelos se utilizaron en el árbol filogenético y en análisis *Bayesian Skyline Plot*.

Un árbol filogenético fue inferido con el programa *Mr. Bayes* v3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012). Se corrieron 15 millones de generaciones y se descartaron los primeros 15,000 árboles. Se usó como grupo externo secuencias de *P. cynomolgi* (GenBank: AB434919.1).

Red de haplotipos. Para investigar las relaciones genealógicas entre los haplotipos se construyó una red de haplotipos utilizando el programa *PopArt* v1.7 (Leigh y Bryant, 2015). La relación entre haplotipos fue resuelta a través de pasos mutacionales, los cuales permitieron la asignación de los haplotipos existentes a un ancestro común en la población (Templeton y Sing, 1993).

Diferenciación genética. Para calcular el índice de diferenciación genética entre regiones geográficas (F_{ST}) se utilizó el programa *Arlequin* v3.5 (Excoffier y Lischer, 2010). Este índice utiliza una escala de 0 a 1, en donde 0 indica ausencia de diferenciación genética y 1 una diferenciación genética máxima. El valor de significancia del promedio de las diferencias entre

pares de nucleótidos por región fue obtenido usando una prueba de permutación con 1000 simulaciones.

Demografía histórica. El programa *BEAST* v1.8.4 (Drummond *et al.*, 2012) se utilizó para el análisis Bayesiano de *Skyline plot*. Se utilizaron como “priors”: el modelo evolutivo HKY, un reloj molecular relajado no correlacionado log normal y el modelo demográfico coalescente “*Bayesian skyline*”, este modelo correlaciona la magnitud y un rango temporal en el cual hubo cambios en el tamaño efectivo de la población (N_e). Una MCMC (Cadenas Markovianas de Monte Carlo) fue corrida por 500 millones de generaciones y los árboles resultantes fueron muestreados cada 100,000 generaciones. El programa *Tracer* v1.5 (Rambaut, 2009) fue utilizado para evaluar los parámetros posteriores: N_e (ESSs > 200) e intervalos del 95% de la densidad posterior más alta.

Las pruebas de neutralidad de D de Tajima (D) (Tajima, 1989) y F_s de F_u (Fu, 1997), así como el análisis de distribuciones *mismatch* (Rogers y Harpending, 1992) fueron determinadas con el programa *DnaSP* v5.1.

El número de casos de la Jurisdicción VII del estado de Chiapas fue obtenido de la Secretaria de Salud Del Estado de Chiapas, Jurisdicción Sanitaria VII, Departamento de Control de Vectores, Programa de Control del Paludismo.

Resultados.

Polimorfismos en el marcador *pvcox1*₅₁₀.

De 171 muestras de sangre infectada con *P. vivax* analizadas se obtuvo la secuencia de 150 muestras (87.7 %) de un tamaño de 510 pb correspondientes a los nucleótidos 1036-1545 del genoma mitocondrial (región 3' del gen *pvcox1*). Para los análisis finales se incluyeron 43 secuencias de la misma región de los años 2001, 2002, 2006 y 2007 obtenidas previamente en nuestro laboratorio (no publicado) para un total de 193 secuencias del SMX. El número de secuencias analizadas por año se presentan en la Tabla 1. Al comparar con la secuencia de referencia *Sal-I* se detectaron tres polimorfismos de un simple nucleótido (G1139A, G1295C y T1593A), los tres polimorfismos fueron no sinónimos (S35N, G82A y F168L). Dicha variación resolvió tres haplotipos, h1 (G1139A, G1295C y T1593A), h2 (G1295C y T1593A) y h3 (similar a la secuencia *Sal-I*), sus frecuencias fueron 69.43 %, 18.65 % y 11.92 %, respectivamente. El haplotipo h1 fue detectado de 1993-2011, el haplotipo h3 se detectó en frecuencias bajas y fluctuantes durante el periodo 1993-2010, mientras que h2 se detectó en 1995 y posteriormente en el año 2002 y años siguientes (Figura 1).

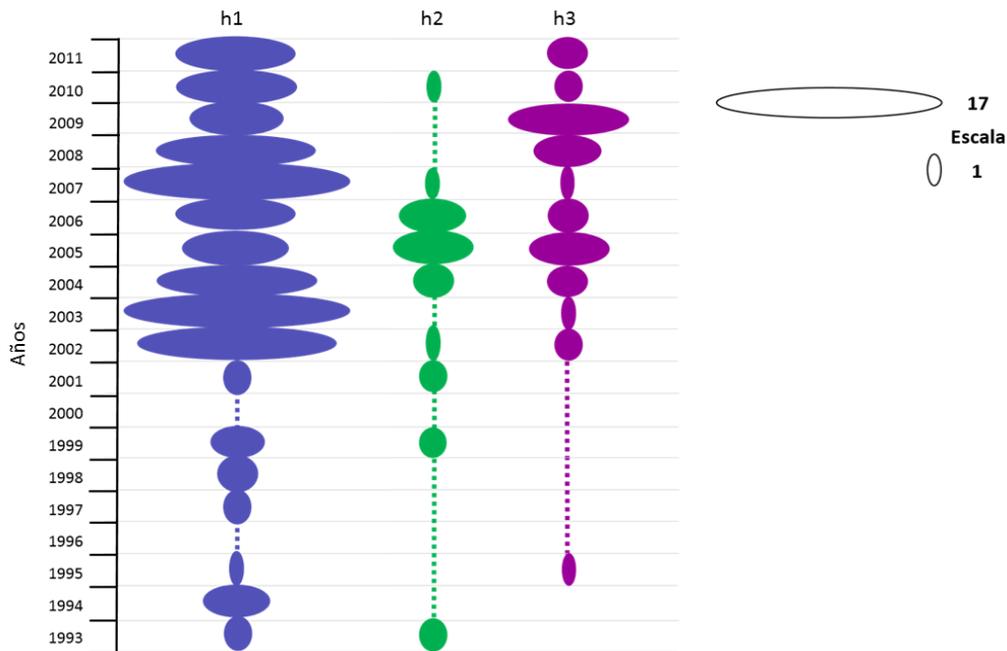


Figura 1. Distribución temporal de los haplotipos *pvcox1510* en el sureste de México. De 193 secuencias tres haplotipos fueron resueltos (h1, h2 y h3). La proporción de cada haplotipo por año es representada por el tamaño de los óvalos. No hubo muestras para los años 1996 y 2000.

Las secuencias del SMX fueron analizadas junto con 791 secuencias obtenidas de diferentes regiones del mundo haciendo un total de 984 secuencias. Un total de 32 polimorfismos fueron localizados al compararlas con la secuencia de referencia (*Sal-I*). Los polimorfismos G1295C y T1539A fueron los más frecuentes, se detectaron en 555 (56.4 %) y 346 (35.2 %) parásitos, respectivamente, pero no se detectaron en SAM y EUR (Tabla 2). El polimorfismo G1295C fue el más frecuente en el SMX (n = 169; 87.2 %), ÁFR (n = 79; 87.8 %), MOR (n = 26; 92.8 %), SAS (n = 87; 87 %) y EAS (n = 123; 98.4 %), pero su frecuencia fue baja en SEA (n = 60; 39 %) y OCE (n = 4; 5.4 %). Por su parte, el polimorfismo T1539A también fue muy frecuente en el SMX (n = 169; 87.2 %) y EAS (n = 91; 72.8 %), el resto de las regiones presentaron frecuencias por debajo del 6 %.

Veintitrés polimorfismos fueron exclusivos de una región dada y se presentaron en frecuencias bajas (0.5-10 %). Ocho polimorfismos fueron exclusivos de SAM y se distribuyeron en 31 (17.1 %) de las secuencias, el resto de las secuencias fueron similares a *Sal-I* (n = 170). Cuatro polimorfismos fueron exclusivos de ÁFR, tres de OCE, SAS y SEA, y solo uno de CAM y MOR (Tabla 2). Otros polimorfismos fueron compartidos entre parásitos de regiones vecinas, el polimorfismo G1139A se detectó en el SMX (n = 134; 69.4 %), MX-CDC (n = 1; 33.3 %) y CAM (Guatemala) (n = 1; 3.0 %), mientras que el polimorfismo T1290A fue compartido a diferentes frecuencias entre SEA (n = 39; 25.3 %), EAS (n = 12; 9.6 %) y OCE (n = 4; 5.4 %). Las tres

secuencias de casos importados MX-CDC también presentaron los polimorfismos G1139A, G1295C y T1593A, y resolvieron dos haplotipos idénticos a los del SMX (h1 y h2) (Tabla 2).

Tabla 2. Polimorfismos del gen mitocondrial *pvcox1*₅₁₀ a nivel global. La secuencia de *Sal-I* fue utilizada como referencia. Los polimorfismos son indicados por los cambios.

		<i>pvcox1</i>																																			
		n	1042	1043	1054	1080	1120	1138	1139	1159	1197	1218	1226	1254	1260	1263	1290	1295	1297	1306	1330	1369	1390	1395	1399	1402	1404	1409	1425	1441	1465	1487	1500	1539			
<i>Sal-I</i>		1	T	T	A	A	A	A	G	C	A	T	T	C	T	C	T	G	T	T	T	T	A	A	G	T	A	T	T	A	C	A	A	T			
NA	SMX	134	A	C	A		
		35	C	A	
		24
	MX-CDC	1	A	C	A	
		1	C	A
CA	CAM	6	
		1	C	
	GUA	1	C
		1	A	C	A
	SAL	4
		1	C
	HON	10
PAN	7	
1	G	
SA	BRA	100	
		7	A	
		2	C
		2	C
		1	C
		1	.	.	G
		1
		1
	PERU	22
		8	A
	COL	1	A	C
		15	C
	VEN	1
		10
		2	A
	ECU	1
2		
1		C	
GUY	1		
EU	ESP	3		
AF	AFRC	9	C	
		1	C	
		1	T	C
	ETI	11
		1
	MAD	61	.	.	.	C
		2	A
		2
1	G		
MO	TUR	24	
		2	
IRAN	2	G	.	.	.		
SA	AFG	2	C	
		28	C	
	INDIA	3
		1	T	.
		1	C	A
	1	G	
	SLK	1	T	
	PAK	54	C
1		
BAN	8	

Los 32 polimorfismos resolvieron 46 haplotipos. El mayor número de haplotipos se detectó en SEA (n = 18) y SAM (n = 10), estas dos regiones también presentaron el mayor número de haplotipos exclusivos, diez y nueve, respectivamente (Tabla 3).

Diversidad genética.

En el SMX, la diversidad nucleotídica (π) fue de 0.0017 ± 0.0002 y la haplotípica (Hd) de 0.471 ± 0.036 . A nivel regional, los valores más altos se registraron en SEA, ($\pi = 0.0031 \pm 0.0001$ y $Hd = 0.746 \pm 0.020$). Mientras que los valores más bajos se presentaron en AFR ($\pi = 0.0004 \pm 0.0002$ y $Hd = 0.191 \pm 0.056$). A nivel global, la diversidad nucleotídica y haplotípica fueron altas ($\pi = 0.0035 \pm 0.0001$ y $Hd = 0.805 \pm 0.008$) (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros de diversidad genética en *pvcox1₅₁₀* de diferentes regiones geográficas.

Región	N	S	H	H ex	Hd (DE)	π (DE)
SMX ¹	196	3	4	0	0.479 \pm (0.035)	0.0017 \pm (0.0002)
CAM	33	4	4	1	0.278 \pm (0.098)	0.0008 \pm (0.0003)
SAM	181	8	10	9	0.304 \pm (0.043)	0.0006 \pm (0.0001)
AFR	90	7	8	4	0.191 \pm (0.056)	0.0004 \pm (0.0001)
MEO	28	2	3	1	0.265 \pm (0.104)	0.0005 \pm (0.0002)
SAS	100	7	7	4	0.285 \pm (0.056)	0.0006 \pm (0.0001)
SEA	154	9	18	10	0.746 \pm (0.020)	0.0031 \pm (0.0001)
EAS	125	6	9	5	0.662 \pm (0.035)	0.0030 \pm (0.0002)
OCE	74	7	9	3	0.298 \pm (0.070)	0.0010 \pm (0.0003)
TOTAL²	984	32	46	37	0.805 \pm (0.008)	0.0035 \pm (0.0001)

N, número de muestras; S, sitios segregativos; H, número de haplotipos; H ex, número de haplotipos exclusivos; Hd, diversidad haplotípica; π , diversidad nucleotídica; DE, desviación estándar. Sureste de México (SMX); Centroamérica (CAM); Sudamérica (SAM); Medio Oriente (MOR); Sur de Asia (SAS); Sudeste de Asia (SEA); Este de Asia (EAS); Oceanía (OCE).

¹ se sumaron las tres secuencias MX-CDC (Rodrigues *et al.*, 2014).

² se sumaron las tres secuencias de España (Gelabert *et al.*, 2016).

Análisis filogenético.

El análisis demostró que *P. vivax* comprende un linaje donde se observaron dos grandes clados: el clado “a” que agrupa parásitos principalmente de SEA y EAS, y el clado “b” que agrupa a parásitos del SMX, MX-CDC, CAM, AFR y SEA. Dentro del clado “b” se detectó un

subclado divergente “b1” (probabilidad posterior = 1) que agrupa a la mayoría de los parásitos del SMX (n = 134), un parásito de MX-CDC y otro de CAM (Guatemala) (Figura 2). Además, se presentaron varios clados divergentes, dados por las probabilidades posteriores > 0.9, que agruparon a parásitos de diferentes regiones (SAM, MOR, AFR, SEA y EAS) (Figura 2).

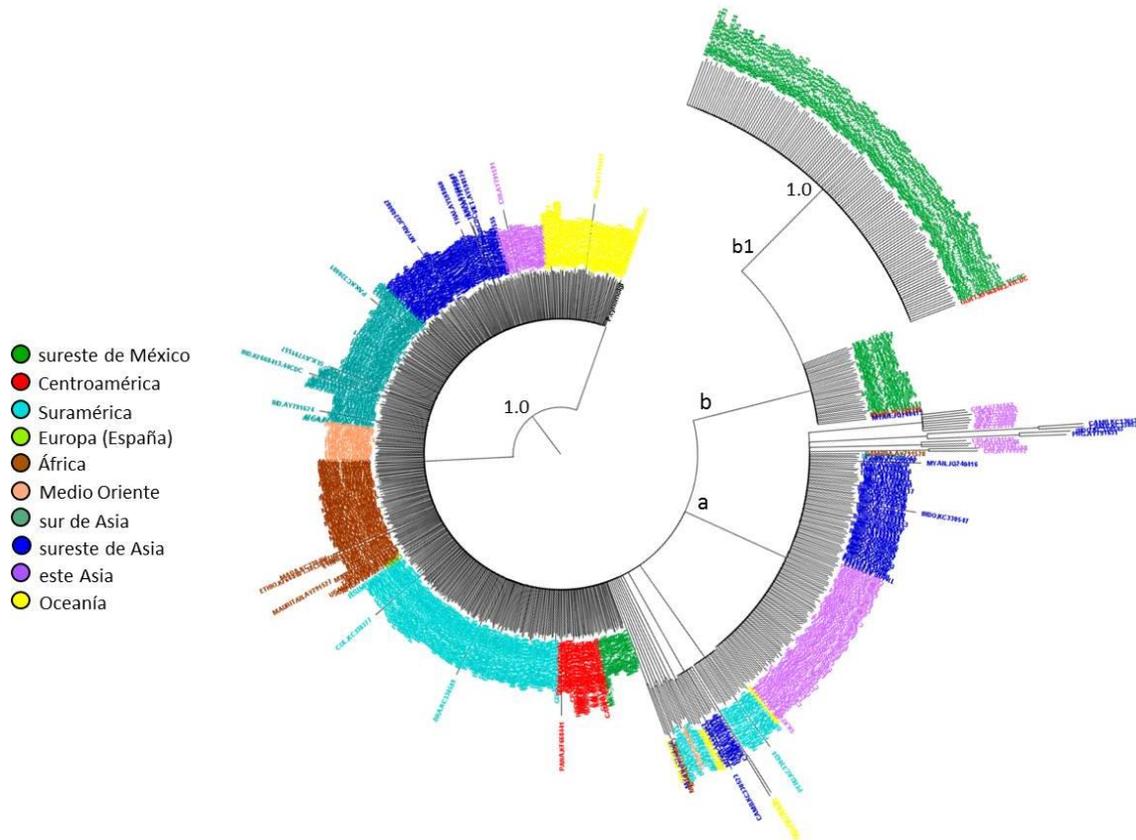


Figura 2. Árbol filogenético de *pvcox1510*. Distribución de las 984 secuencias de *pvcox1510* obtenidas de diferentes regiones geográficas. Cada color representa a una región geográfica. Dos grandes clados fueron resueltos: “a” y “b”. Dentro del clado “b” se detectó un subclado divergente “b1” con soporte posterior de 1.0. Se utilizó como grupo externo a *P. cynomolgi*. Las tres secuencias de MX-CDC se marcaron con el mismo color que las secuencias del sureste de México, una de ellas se ubicó en el subclado “b1”.

Relaciones genealógicas.

La red muestra 46 haplotipos definidos por *pvcox1510* interconectados por un sólo paso mutacional. Los haplotipos principales h3 y h4 mostraron frecuencias de 32.3 % y 27.7 %, respectivamente; ambos haplotipos presentaron procesos de diversificación. Veintinueve de los 46 haplotipos derivaron de los haplotipos principales (Figura 3). El haplotipo h3 se detectó en parásitos de todas las regiones geográficas analizadas, un alto porcentaje de parásitos de SAM (82.9 %), OCE (82.4 %), CAM (81.8 %) y SEA (31.8 %) presentaron este haplotipo.

Además, en los tres parásitos de EUR (España), solo un 12.4 % de los parásitos del SMX se identificaron con el haplotipo h3. Mientras que el haplotipo h4 se presentó principalmente en parásitos de AFR (90 %), MOR (85.7 %), SAS (84 %) y EAS (23.2 %); ningún parásito del SMX fue identificado con este haplotipo. Los haplotipos h1 y h2 fueron detectados mayoritariamente en parásitos del SMX, el haplotipo h1 representó al subclado “b1” de la figura 2, mientras que el haplotipo h2 se detectó en parásitos de MX-CDC (n = 2), AFR (Madagascar, n = 2) y SEA (Myanmar, n = 1) (Figura 3).

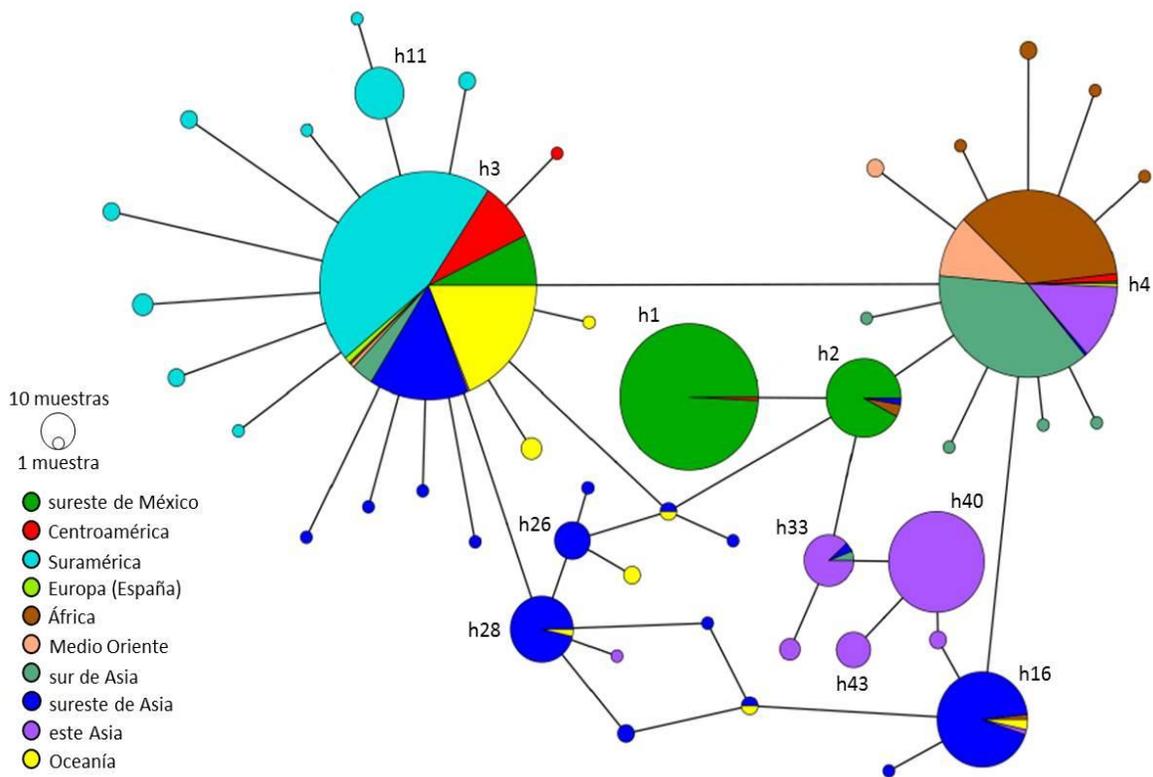


Figura 3. Red de haplotipos global de *pvcox1510*. Cada círculo corresponde a un haplotipo (46 haplotipos) y cada color representa el origen de los parásitos. Solo los haplotipos más frecuentes ($n \geq 9$) fueron marcados. El tamaño del círculo es proporcional al número de muestras que tienen el mismo haplotipo. Las tres muestras MX-CDC se marcaron con el mismo color que las del SMX, una secuencia fue asignada a h1 y dos a h2.

Diferenciación genética.

Los valores de F_{ST} pareadas oscilaron ampliamente entre 0.00175-0.75953. Los valores más bajos se obtuvieron entre MOR - AFR, MOR - SAS, CAM - SAM, CAM - OCE y SAM - OCE, en el resto de las comparaciones los valores fueron altos y significativos (Tabla 4). Los valores de F_{ST} que presentó el SMX comparado con todas las regiones fueron altos y significativos,

incluyendo CAM (0.52246, $P < 0.05$) y SAM (0.56126, $P < 0.05$). Sin embargo, entre CAM y SAM se detectó un valor de F_{ST} bajo (Tabla 4)

Tabla 4. Valores de F_{ST} de *pvcox1510* entre poblaciones de *P. vivax* de diferentes regiones geográficas.

Región	SMX	CAM	SAM	AFR	MOR	SAS	SES	EAS
CAM	0.52246*							
SAM	0.56126*	0.01533						
AFR	0.62724*	0.75953*	0.73535*					
MOR	0.57443*	0.68438*	0.68603*	0.00558				
SAS	0.59179*	0.65964*	0.67326*	0.02098*	0.00978			
SEA	0.36812*	0.24153*	0.29364*	0.48847*	0.40551*	0.43990*		
EAS	0.43739*	0.46062*	0.53115*	0.43940*	0.35986*	0.40006*	0.28959*	
OCE	0.54159*	0.00175	0.01303	0.75442*	0.69121*	0.67579*	0.24759*	0.49146*

Valores de significancia: * $P < 0.05$. sureste de México (SMX); Centroamérica (CAM); Suramérica (SAM); Medio Oriente (MOR); sur de Asia (SAS); sureste de Asia (SEA); este de Asia (EAS); Oceanía (OCE).

Demografía histórica en el sureste de México.

El análisis *Bayesian Skyline Plot* demostró una reducción del tamaño efectivo de la población (N_e) de *P. vivax*, los valores posteriores del tamaño efectivo de muestra fueron > 200 indicando significancia (ESS = 233). Se observó que el N_e presentó una disminución constante de 1993-2001, la reducción se hizo más notable a partir del año 2002 y hasta el año 2008, después de este año se mantuvo constante hasta el año 2011 (Figura 4). No se observó relación entre el N_e y las fluctuaciones en el número de casos de paludismo reportados. Por otra parte, una distribución unimodal fue observada en el análisis de *mismatch* (Figura 5), mientras que los valores para las pruebas de neutralidad fueron positivos ($D = 1.1227$ y $F'sFu = 1.533$), pero no significativos ($P > 0.05$).

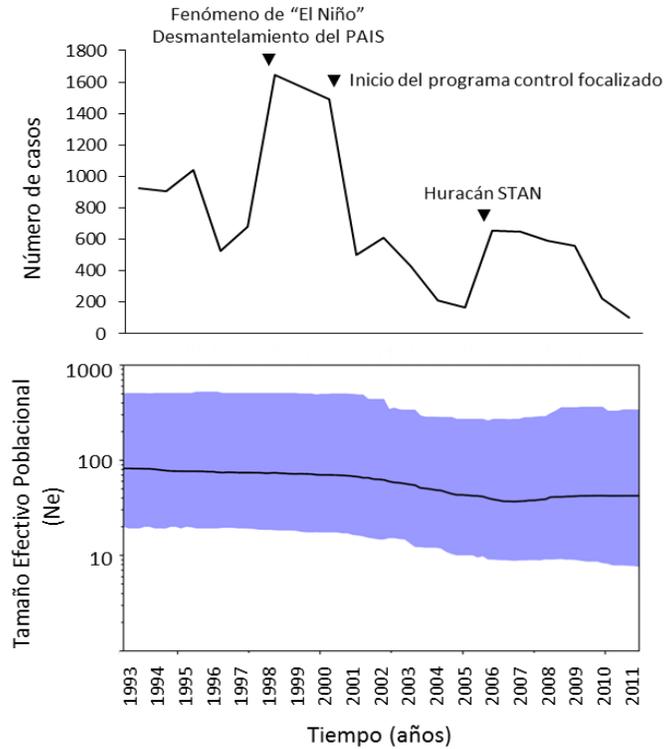


Figura 4. Análisis *Bayesian Skyline Plot* del fragmento *pvcox1₅₁₀* del sureste de México. Arriba se presenta incidencia anual de los casos clínicos de paludismo confirmados durante el periodo 1993-2011 en la jurisdicción VII del estado de Chiapas. Abajo el análisis *Bayesian Skyline Plot*, la línea negra representa la mediana del tamaño poblacional ancestral, y la región de color azul representa el 95 % de la probabilidad posterior. El eje X muestra el tiempo en unidades de años, el tiempo actual corresponde al año 2011, mientras que el eje Y muestra el tamaño efectivo poblacional (N_e) en escala logarítmica.

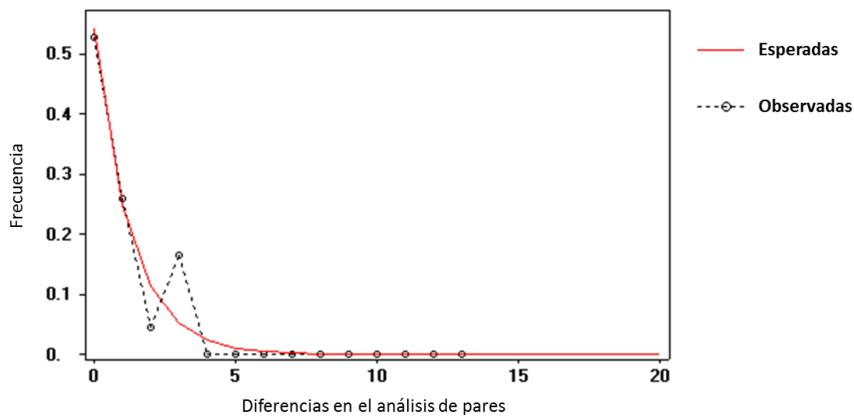


Figura 5. Distribución *mismatch* en el marcador *pvcox1₅₁₀* del sureste de México. La gráfica ilustra las frecuencias en las diferencias del análisis por pares bajo un modelo de tamaño poblacional constante. La línea sólida indica las discordancias esperadas mientras que la línea punteada indica las discordancias observadas.

Discusión.

Previos estudios con el genoma mitocondrial de *P. vivax* han detectado alta diferenciación genética entre regiones geográficas (Taylor *et al.*, 2013; Hupalo *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2018). Además, se ha observado que la diversidad genética en Suramérica es tan alta como la de Asia, y ambas poblaciones presentan expansión poblacional (Taylor *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2018). La alta diversidad genética en Suramérica se ha atribuido a eventos sucesivos de introducción independientes de parásitos ya extintos de Europa que descendían de linajes africanos y asiáticos, y posteriormente recombinaron y diversificaron a nivel local (Rodrigues *et al.*, 2018). En el presente trabajo, utilizando 510 pb que corresponde a la región 3' del gen mitocondrial citocromo oxidasa 1 de *P. vivax* (*pvcox1₅₁₀*), analizamos la variación y diferenciación genética de *P. vivax* en el sureste de México, y se comparó con parásitos de otras regiones geográficas. Además, por primera vez documentamos su demografía histórica. Previamente se ha tratado de describir la llegada de *P. vivax* a América. La hipótesis más aceptada es que los parásitos de Suramérica descienden de los linajes europeos extintos, que provenían de linajes africanos y asiáticos traídos a Suramérica con los viajes post-colombinos, en donde diversificaron de manera local (Culleton *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2013; Gelabert *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2018). Nuestros resultados apoyan esta hipótesis, detectamos diez haplotipos exclusivos en Suramérica (resultado de ocho polimorfismos exclusivos de la región) y varios clados divergentes, lo que sugiere que esta población ha diversificado de manera local. Además, a nivel global detectamos un haplotipo muy frecuente (h3) en todas las regiones geográficas analizadas, principalmente en América (Sur y Centroamérica, y sureste de México), y presentó diversificación alta. Los tres parásitos de España, que datan de 1942-1944, también se identificaron con este haplotipo. Gelabert *et al.*, (2016) con el genoma mitocondrial obtuvo mayor resolución en el análisis de genealogía y detectó a estos tres parásitos de España como un haplotipo a un paso mutacional de un haplotipo muy frecuente en Suramérica.

Cómo *P. vivax* llegó a Centroamérica y México sigue siendo una incógnita. Pero es posible que la historia sea muy similar a la de Suramérica. Después de la llegada de los españoles a lo que ahora es México, se comenzó con el establecimiento de colonias y rutas de comercio en las costas del Golfo que favorecían la generación de focos de transmisión de enfermedades como el paludismo (Carrillo, 2002). Un estudio con los bloques *icb5-6* de *pvmsp1* sugiere procesos de recombinación entre linajes genealógicamente separados posiblemente provenientes del sureste de Asia y el Medio Oriente, una posterior divergencia y expansión poblacional en el sureste de México (Cerritos *et al.*, 2014). En este contexto, los tres haplotipos del SMX se presentaron muy relacionados a los haplotipos más frecuentes y

posiblemente ancestrales h3 y h4. Además, el clado “b” del análisis filogenético agrupó casi de manera exclusiva a los parásitos del sureste de México, sugiriendo divergencia.

La presencia de un parásito de Guatemala dentro del subclado “b1” sugiere que podría corresponder a un parásito mexicano importado a Guatemala y posteriormente a los Estados Unidos de América. Lo cual es congruente con los movimientos poblacionales en la frontera sur de México y Guatemala.

Estudios de *P. vivax* en el sureste de México analizando el genoma nuclear han reportado diversidad genética (π) media-alta (Hupalo *et al.*, 2016; de Oliveira *et al.*, 2017). Aquí, con un fragmento del gen *pvcox1* identificamos una diversidad baja-media. Ya que la prueba de diversidad (π) se basa en las frecuencias nucleotídicas, el valor bajo-medio de diversidad observado puede ser explicado por la presencia de un haplotipo altamente frecuente (70 %) y dos haplotipos con frecuencias bajas (12.4 y 17.6 %). Además, el hecho de que solo hayamos encontrado tres polimorfismos en 193 secuencias sugiere que la diversidad genética dada por *pvcox1*₅₁₀ es baja en el sureste de México.

En Centroamérica se ha reportado diversidad genética baja utilizando el genoma mitocondrial, pero ha sido atribuida al reducido número de muestras, que pudieran no ser representativas de las poblaciones de *P. vivax* en esa región (Taylor *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2018). Por el contrario, en Suramérica se ha reportado diversidad genética alta con el genoma mitocondrial (Taylor *et al.*, 2013; Gelabert *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2018) y el nuclear (Hupalo *et al.*, 2016; de Oliveira *et al.*, 2017), dicha diversidad alta se atribuye a la mezcla de linajes ancestrales introducidos sucesivamente desde Europa y posterior diversificaron (Rodrigues *et al.*, 2018). En el presente trabajo detectamos valores de diversidad bajos en Centroamérica y Suramérica, el valor de diversidad genética bajo en Suramérica puede ser explicado por la presencia de un haplotipo altamente frecuente (82.9 %) y muchos haplotipos raros o en frecuencias bajas.

Resultados previos con el genoma mitocondrial han reportado ausencia de diferenciación genética entre *P. vivax* de Centro y Suramérica (Taylor *et al.*, 2013); además con el genoma nuclear se ha reportado diferenciación alta entre México y Suramérica (de Oliveira *et al.*, 2017) y con genes como *pvmrd1* y *pvmsp1* se ha observado diferenciación entre el sureste de México y Centroamérica (Gutiérrez *et al.*, 2016; González-Cerón *et al.*, 2017). Nuestros resultados mostraron alta diferenciación del sureste de México con Centroamérica y Suramérica, pero no entre Centroamérica y Suramérica. Este resultado es apoyado por un estudio genómico que demostró que los parásitos del sureste de México presentan identidad por descendencia con un ancestro común reciente que explica una agrupación única (Hupalo *et al.*, 2016). La poca información de la región de Centroamérica no ha permitido generar un

panorama más amplio de las relaciones genéticas de *P. vivax* entre esta región y el sureste de México.

Por otra parte, no encontramos diferenciación genética entre los parásitos de Centroamérica, Suramérica y Oceanía. Carter *et al.*, (2003) especula sobre la relación de las poblaciones de América con Oceanía y propone que los hipnozoítos fueron capaces de sobrevivir a los largos viajes oceánicos precolombinos desde el este del Pacífico hasta Suramérica a través de la ruta Kon-Tiki, este supuesto es apoyado por Rodrigues *et al.*, (2018) quien detectó significativo flujo génico de las poblaciones de *P. vivax* de Oceanía a América.

Diversos factores como las actividades antropogénicas y fenómenos meteorológicos pueden afectar las dinámicas poblacionales de las especies. A mediados de la década de los 1980's surgió brote epidémico de paludismo en México, se sugirió que se debió a la descentralización del sistema de salud y el desmantelamiento de la Campaña Internacional para la Erradicación del Paludismo (CNEP) (Gómez-Dantés y Birn, 2000). Los fenómenos meteorológicos "El Niño" (1997-1998) y el huracán Stan (2005), así como el desmantelamiento del Programa de Acciones Intensivas y Simultáneas (PAIS) en 1998 pudieron ser factores que favorecieron el aumento de la transmisión de paludismo en el sureste de México durante 1998-2000 y 2006-2009.

A pesar de los picos detectados en el número de casos en 1998-2000 y 2006-2009, no se observó aumento en el tamaño efectivo de la población (N_e), por el contrario, un decline constante del N_e fue observado durante 1993-2011. El incremento en el número de casos no necesariamente aumenta el N_e , hipotetizamos que la circulación de parásitos muy similares genéticamente, recombinación entre genotipos muy similares (Capítulo 1) y baja transmisión en la región pudo generar expansiones de tipo clonal donde solo ciertos haplotipos aumentaron sus frecuencias, como se ha observado en otras regiones de baja transmisión de *P. falciparum* (Obaldia *et al.*, 2015; Sáenz *et al.*, 2015). El análisis de distribución *mismatch* y los valores positivos de las pruebas de neutralidad de D de Tajima y $F's$ de F_u también sugiere contracción poblacional en el sureste de México. Sin embargo, las pruebas de neutralidad no fueron significativas. La falta de significancia puede ser consecuencia del limitado número de polimorfismos detectados, este tipo de pruebas son más poderosas cuando se incrementa el número de sitios polimórficos (Ramírez-Soriano *et al.*, 2008).

Un análisis demográfico utilizando el genoma mitocondrial reportó que las poblaciones de *P. vivax* están en expansión, excepto la poblacional de Centroamérica que presenta una contracción poblacional explicada por un cuello de botella que se generó por la introducción reciente de un linaje de *P. vivax* que llegó con los europeos (Taylor *et al.*, 2013). Los autores de este trabajo explican que este resultado podría deberse a la falta de muestras disponibles para la región ($n=10$). Nosotros, utilizando el 10 % del genoma mitocondrial y aumentando el

número de muestras a 33 obtuvimos resultados muy similares a los reportados por Taylor *et al.*, (2013) para Centroamérica.

Otra posible explicación para el cuello de botella reportado en Centroamérica es que la diversidad genética que llegó a esta región con los europeos no pudo mantenerse y solo algunos genotipos pudieron adecuarse a los vectores y/o al hospedero humano de la región (Molina-Cruz y Barillas-Mury, 2014). Un ejemplo de adaptación al vector fue registrado en el sureste de México donde se detectaron tres subpoblaciones de *P. vivax*, una localizada en las costas transmitida principalmente por *An. albimanus*; y dos subpoblaciones localizadas en las colinas transmitidas principalmente por *An. pseudopunctipennis* (Joy *et al.* 2008). Resultados similares se observaron con las proteínas Pvs25 y Pvs28, involucradas en la adhesión del oocineto al intestino del mosquito, se identificaron tres genotipos Pvs 25/28 (A, B1 y B2), el genotipo A fue transmitido por *An. albimanus*, y los genotipos B1 y B2 pueden encontrarse en ambos vectores con una preferencia por *An. pseudopunctipennis*. (González-Cerón *et al.*, 2010).

Conclusiones.

Los resultados del presente trabajo nos permiten concluir que la población de *P. vivax* del sureste de México presenta una baja diversidad genética y reciente reducción de su tamaño efectivo poblacional (N_e), como posible consecuencia de la acción de los programas de control durante 1993-2011. La comparación de los análisis poblacionales de *P. vivax* del sureste de México con las poblaciones de parásitos de otras regiones geográficas sugieren que los parásitos del sureste de México podrían tener una historia muy similar a la de Suramérica: una población descendiente de los linajes extintos de Europa que diversificaron de manera local. Además, los valores significativos de F_{ST} que presenta el sureste de México y la presencia de un clado casi exclusivos de parásitos del sureste de México sugieren un proceso de divergencia. Para reforzar los resultados aquí presentados serán necesarios análisis genómicos que nos permitan analizar el máximo número de polimorfismos en cada muestra, de esta manera el nivel de resolución en los análisis será mayor.

Referencias.

- Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, Caler E, *et al.* Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature*. 2008; 455(7214):757–63.
- Carrillo AM. Economía, política y salud pública en el México porfiriano (1876-1910). *História, Ciências, Saúde–Manguinhos*. 2002; 9(suplemento):67–87.
- Carter, R. Speculations on the origins of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol*. 2003; 19(5):214–219.

- Cerritos R, González-Cerón L, Nettel JA, Wegier A. Genetic structure of *Plasmodium vivax* using the merozoite surface protein 1 icb5-6 fragment reveals new hybrid haplotypes in southern Mexico. *Malar J.* 2014; 13:35.
- Chenet SM, Tapia LL, Escalante AA, Durand S, Lucas C, Bacon DJ. Genetic diversity and population structure of genes encoding vaccine candidate antigens of *Plasmodium vivax*. *Malar J.* 2012; 11:68.
- Cornejo OE, Escalante AA. The origin and age of *Plasmodium vivax*. *Trends Parasitol.* 2006; 22:558–563.
- Culleton R, Coban C, Zeyrek FY, Cravo P, Kaneko A, Randrianarivelosia M, *et al.* The origins of African *Plasmodium vivax*; insights from mitochondrial genome sequencing. *PLoS One.* 2011; 6(12):e29137.
- Culleton R, Carter R. African *Plasmodium vivax*: distribution and origins. *Int J Parasitol.* 2012;42(12):1091–1097.
- Cunha MG, Medina TS, Oliveira SG, Marinho AN, Póvoa MM, Ribeiro-dos-Santos AKC, *et al.* Development of a polymerase chain reaction (PCR) method based on amplification of mitochondrial DNA to detect *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Acta Trop.* 2009; 111:35–38.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R and Posadas D. “jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing”. *Nat. Methods.* 2012; 9(8):772.
- de Oliveira TC, Rodrigues PT, Menezes MJ, Gonçalves-Lopes RM, Bastos MS, Lima NF, *et al.* Genome-wide diversity and differentiation in New World populations of the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; 11(7):e0005824.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol.* 2012; 29:1969–1973.
- Echeverry DF, Deason NA, Makuru V, Davidson J, Xiao H, Niedbalski J, *et al.* Fast and robust single PCR for *Plasmodium* sporozoite detection in mosquitoes using the cytochrome oxidase I gene. *Malar J.* 2017; 16(1):230.
- Escalante AA, Cornejo OE, Freeland DE, Poe AC, Durrego E, Collins WE, *et al.* 2005. A monkey's tale: the origin of *Plasmodium vivax* as a human malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:1980–1985.
- Espinosa GCA. (2015). Análisis temporal de las variants antigénicas de la proteína de unión al receptor Duffy (*PvdbpII*) de *Plasmodium vivax* en el sureste de México (tesis de maestría). CRISP-INSP, Tapachula, Chiapas, México.
- Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 2010; 10:564–567.

- Flores-Alanis A, González-Cerón L, Santillán F, Ximenes C, Sandoval MA, Cerritos R. Temporal genetic changes in *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 over 19 years of transmission in southern Mexico. *Parasit Vectors*. 2017; 10(1):217.
- Ferreira MU, Rodrigues PT. Tracking malaria parasites in the eradication era. *Trends Parasitol*. 2014; 30(10):465-466.
- Fu YX. Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. 1997; *Genetics*. 147:915–925.
- Gómez-Dantés H, Birn AE. Malaria and social movements in Mexico: the last 60 years. *Parassitologia*. 2000; 42:69–85.
- Gonzalez-Ceron L, Rodriguez MH, Wirtz RA, Sina BJ, Palomeque OL, Nettel JA, *et al*. *Plasmodium vivax*: a monoclonal antibody recognized a circumsporozoite protein precursor on the sporozoite surface. *Exp Parasitol*. 1998; 90(3):203–11.
- González-Cerón L, Martínez-Barnette J, Montero-Solís C, Santillán F, Soto AM, Rodríguez MH, *et al*. Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax* in Latin America: polymorphism and evolutionary relationships of the circumsporozoite gene. *Malar J*. 2013; 12:243.
- González-Cerón L, Cerritos R, Corzo-Mancilla J, Santillán F. Diversity and evolutionary genetics of the three major *Plasmodium vivax* merozoite genes participating in reticulocyte invasion in southern Mexico. *Parasit Vectors*. 2015; 8(1):651.
- González-Cerón L, Montoya A, Corzo-Gómez JC, Cerritos R, Santillán F, Sandoval MA. Genetic diversity and natural selection of *Plasmodium vivax* multi-drug resistant gene (*pvm-dr1*) in Mesoamerica. *Malar J*. 2017; 16(1):261.
- Gravel S, Henn BM, Gutenkunst RN, Indap AR, Marth GT, Clark AG, *et al*. Demographic history and rare allele sharing among human populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108:11983–11988.
- Gutiérrez S, González-Cerón L, Montoya A, Sandoval MA, Tórres ME, Cerritos R. Genetic structure of *Plasmodium vivax* in Nicaragua, a country in the control phase, based on the carboxyl terminal region of the merozoite surface protein-1. *Infect Genet Evol*. 2016; 40: 324–330.
- Hupaló DN, Luo Z, Melnikov A, Sutton PL, Rogov P, Escalante A, *et al*. Population genomics studies identify signatures of global dispersal and drug resistance in *Plasmodium vivax*. *Nat Genet*. 2016; 48(8):953–958.
- Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki T, Ferreira MU, Kanbara H, Hughes AL. Mitochondrial genome sequences support ancient population expansion in *Plasmodium vivax*. *Mol Biol Evol*. 2005; 22:1733–1739.
- Joy DA, Gonzalez-Ceron L, Carlton JM, Gueyes A, Fay M, McCutchan TF, *et al*. Local adaptation and vector-mediated population structure in *Plasmodium vivax* malaria. *Mol Biol Evol*. 2008; 25(6):1245–52.

- Leigh JW, Bryant D. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol.* 2015; 6(9):1110–1116.
- Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 2009; 25(11):1451–1452.
- Liu W, Li Y, Shaw KS, Learn GH, Plenderleith LJ, Malenke JA, *et al.* African origin of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nat Commun.* 2014; 5:3346.
- Loh JP, Gao QH, Lee VJ, Tetteh K, Drakeley C. Utility of COX1 phylogenetics to differentiate between locally acquired and imported *Plasmodium knowlesi* infections in Singapore. *Singapore Med J.* 2016; 57(12):686–689.
- Molina-Cruz A, Barillas-Mury C. The remarkable journey of adaptation of the *Plasmodium falciparum* malaria parasite to New World anopheline mosquitoes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014; 109(5):662–7.
- Mu J, Joy DA, Duan J, Huang Y, Carlton J, Walker J, *et al.* Host switch leads to emergence of *Plasmodium vivax* malaria in humans. *Mol Biol Evol.* 2005; 22:1686–1693.
- Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM, Cuchillo-Foix CM. Lehninger principios de bioquímica. 2001. Omega (3a ed.). Barcelona.
- Obaldia N, III, Baro NK, Calzada JE, Santamaria AM, Daniels R, Wong W, *et al.* Clonal outbreak of *Plasmodium falciparum* infection in eastern Panama. *J Infect Dis.* 2015; 211(7):1087–1096.
- Pattaradilokrat S, Tiyananee W, Simpailipan P, Kaewthamasorn M, Saiwichai T, Li J, *et al.* Molecular detection of the avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum* in Thailand. *Vet Parasitol.* 2015; 210(1-2):1–9.
- Pearson RD, Amato R, Auburn S, Miotto O, Almagro-Garcia J, Amaratunga C, *et al.* Genomic analysis of local variation and recent evolution in *Plasmodium vivax*. *Nat Genet.* 2016; 48(8):959–964.
- Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol.* 2008; 25:1253–1256.
- Rambaut A, Ho SY, Drummond AJ, Shapiro B. Accommodating the effect of ancient DNA damage on inferences of demographic histories. *Mol Biol Evol.* 2009; 26(2):245–248.
- Ramírez-Soriano A, Ramos-Onsins SE, Rozas J, Calafell F, Navarro A. Statistical power Analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics.* 2008; 179(1):555–67.
- Rodrigues PT, Alves JM, Santamaria AM, Calzada JE, Xayavong M, Parise M, *et al.* Using mitochondrial genome sequences to track the origin of imported *Plasmodium vivax* infections diagnosed in the United States. *Am J Trop Med Hyg.* 2014; 90(6):1102–1108.
- Rodrigues PT, Valdivia HO, de Oliveira TC, Alves JMP, Duarte AMRC, Cerutti-Junior C, *et al.* Human migration and the spread of malaria parasites to the New World. *Sci Rep.* 2018; 8(1):1993.

- Rodriguez MH, Gonzalez-Ceron L, Hernandez JE, Nettel JA, Villarreal C, Kain KC, *et al.* Different prevalences of *Plasmodium vivax* phenotypes VK210 and VK247 associated with the distribution of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 2000; 62(1):122–7.
- Rogers AR, Harpendin H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol.* 1992; 9:552–569.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, *et al.* MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol.* 2012; 61(3):539–542.
- Sáenz FE, Morton LC, Okoth SA, Valenzuela G, Vera-Arias CA, Vélez-Álvarez E, *et al.* Clonal population expansion in an outbreak of *Plasmodium falciparum* on the northwest coast of Ecuador. *Malar J.* 2015; 13(1):497.
- Simonsen KL, Churchill GA, Aquadro CF. Properties of statistical tests of neutrality for DNA polymorphism data. *Genetics.* 1995; 141:413–429.
- Stalkin M, Hudson RR. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics.* 1991; 129(2):555–62.
- Tajima F. Statistical-method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics.* 1989; 123:585–595.
- Taylor JE, Pacheco MA, Bacon DJ, Beg MA, Machado RL, Fairhurst RM, *et al.* The evolutionary history of *Plasmodium vivax* as inferred from mitochondrial genomes: Parasite genetic diversity in the Americas. *Mol Biol Evol.* 2013; 30(9):2050–64.
- Templeton AR, Sing CF. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics.* 1993; 134(2):659–69.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22(22):4673–80.
- Waltmann A, Koepfli C, Tessier N, Karl S, Fola A, Darcy AW, *et al.* Increasingly inbred and fragmented populations of *Plasmodium vivax* associated with the eastward decline in malaria transmission the Southwest Pacific. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018; 12(1):e0006146.
- Yusof R, Ahmed MA, Jelip J, Ngian HU, Mustakim S, Hussin HM, *et al.* Phylogeographic evidence for 2 genetically distinct zoonotic *Plasmodium knowlesi* parasites. *Emerg Infect Dis.* 2016; 22(8):1371–80.

6. Comentarios finales y perspectivas.

En el presente trabajo analizamos la diversidad genética, estructura poblacional y demografía histórica de *P. vivax* en el sureste de México durante 1993-2011. El análisis de los resultados obtenidos y la información epidemiológica recabada indican que el foco de transmisión persistente del sureste de México ha presentado una tendencia a la disminución gradual en el número de casos de paludismo y decremento en el número de infecciones con genotipos múltiples (IGMs) desde 1993. El mayor número de casos se registro entre 1993-2000, en el mismo periodo se concentraron la mayoría de las IGMs, y en los años posteriores cuando el número de casos fue menor, el número de IGMs fue mucho más bajo. La reducción del número de casos y de las IGMs concuerda con el aumento del desequilibrio de ligamiento durante 2002-2011. También se detecto la persistencia de parásitos divergentes durante 1993-2011, estos parásitos divergentes pudieron ser producto de eventos de recombinación antigua, pero con la reducción de la transmisión se han reducido las probabilidades de la generación de nuevas variantes genéticas por recombinación, y consigo se ha generado una transmisión de tipo clonal, donde la recombinación sigue ocurriendo, pero se da entre genotipos idénticos o muy similares. Además, se sabe que la reducción de la transmisión, recombinación y diferenciación genética en una región pueden afectar el tamaño efectivo de las poblaciones. En este estudio, detectamos una tendencia a la disminución gradual del tamaño efectivo de la población del parásito durante 1993-2011 y alta diferenciación genética de la población del sureste de México.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren la fragmentación de la población del parásito y aumento en la endogamia, estos indicadores pueden ser el reflejo de la reducción de la transmisión del paludismo desde 1993.

Los análisis temporales de genética de poblaciones nos permiten entender la biología, patogénesis, epidemiología y evolución de *P. vivax*, y son útiles para evaluar los avances en el control de la enfermedad y en la vigilancia epidemiológica en la región. La genotipificación de múltiples loci nos permitirá determinar el número de genotipos en una infección y a distinguir si una infección es resultado de una recaída o de una infección nueva, ayudando a entender las dinámicas de transmisión. El análisis de marcadores bajo selección natural, como candidatos para vacunas, de resistencia a fármacos o especificidad en la infectividad del vector, pueden ser útiles para inferir la historia evolutiva de eventos de selección, detectar el surgimiento de nuevas mutaciones benéficas para el parásito y rastrear sus dispersiones en la región y a través del mundo. El conocimiento de los cambios a nivel genético de las proteínas involucradas en los procesos de infección es importante para el desarrollo y monitoreo de

vacunas y métodos de diagnóstico. Además, los patrones de variación genética entre poblaciones a diferentes escalas geográficas nos permitirán hacer inferencias de la estructura entre poblaciones. Esta información es de utilidad para identificar de los linajes existentes en cada sitio geográfico, si los parásitos pueden ser genotipados a su lugar de origen, los casos locales e importados pueden ser teóricamente detectados. Toda esa información puede culminar en la descripción de mapas de la diversidad genética del parásito que podría ayudar a mejorar nuestro conocimiento sobre las dinámicas de transmisión y observar cambios en respuesta a las medidas de control, fenómenos naturales y/o sociales.

Finalmente, los estudios de genética se han visto beneficiados por las nuevas herramientas moleculares y tecnologías de secuenciación de alto rendimiento. Diversos genomas de *P. vivax* han sido obtenidos en diferentes regiones geográficas y han ayudado a obtener una mejor resolución de su genética poblacional. Los futuros estudios de *P. vivax* en el sureste de México podrían hacer uso de estas tecnologías para análisis de genómica poblacional, ampliando nuestro conocimiento de la biología, patogénesis y evolución del parásito, y en la vigilancia epidemiológica molecular del paludismo.

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo tenemos las siguientes perspectivas:

- Detectar epítomos de células B en las secuencias de aminoácidos de las proteínas PvMAP1₄₂ y PvAMA1_{I-II}, y proyectar sus frecuencias en el tiempo. Las variantes más frecuentes se podrán utilizar para obtener proteínas recombinantes.
- Evaluar la capacidad de las proteínas recombinantes (PvMAP1₄₂ y PvAMA1_{I-II}) de manera individual y en combinación en la detección de anticuerpos en sueros de personas sintomáticas o asintomáticas y pacientes en seguimiento. Con el fin de desarrollar un método diagnóstico que ayude a la vigilancia epidemiológica.
- Realizar análisis de los cambios genéticos en el tiempo con diversos marcadores de interés (microsatélites, SNPs, mitocondria, genes bajo selección), esto permitirá obtener conocimiento más amplio de la genética poblacional del parásito en la región.
- Dar seguimiento de la genética poblacional del parásito en la región, de 2012 a la actualidad. Así como iniciar estudios de genómica de poblaciones de *P. vivax* en el foco de transmisión de noroeste del país y en la frontera sur de México con Guatemala y Belice, y en Centroamérica.

7. Anexos.

Anexo 1. Números de acceso, regiones y país de las secuencias de *pvmsp1₄₂* utilizadas en este estudio.

Número de acceso NCBI	N	Región	País	Referencia
KR871926 - KR872017	92	Centroamérica	Nicaragua	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2015
JF682785 - JF682790	11	Suramérica	Brasil	Putaporntip <i>et al.</i> , 2000
AB564559 - AB564588	30	Medio Oriente	Turquía	Zeyrek <i>et al.</i> , 2010
EU430452 - EU430479 AF435616 - AF435620 KF612323 AF435639	40	Sur de Asia	India - Bangladesh	Thakur <i>et al.</i> , 2008 Sheikh <i>et al.</i> , 2014 Putaporntip <i>et al.</i> , 2002
GU175174 - GU175268 AJ292349 - AJ292359	106	Sur de Asia	Sri Lanka	Dias <i>et al.</i> , 2011 Manamperi <i>et al.</i> , no publicado
JX490129 - JX490156	28	Sureste de Asia	Myanmar	Zhou y Chen, no publicado
AF199393 - AF199404 AF199408 - AF199410 AF435595 - AF435599 AF435601 - AF435615 GQ890872 - GQ891041 GQ912337	206	Sureste de Asia	Tailandia	Putaporntip <i>et al.</i> , 2000 Putaporntip <i>et al.</i> , 2002 Jongwutiwes <i>et al.</i> , 2010
JX461286 - JX461295 JX461300 - JX461310 JX461312 - JX461317 JX461319 - JX461333 JX461297 JX461298	44	Sureste de Asia	Camboya	Parobek <i>et al.</i> , 2014
GU971656 - GU971705	50	Sureste de Asia	Singapur	Ng <i>et al.</i> , 2010
JX490129 - JX490156 JX993754 JX993755	30	Este de Asia	China	Zhu <i>et al.</i> , 2016 Zhou y Chen, no publicado
HQ171934 - HQ171941 AF435635 - AF435638 JQ446312 - JQ446322	198	Este de Asia	Corea del Sur	Han <i>et al.</i> , 2011 Putaporntip <i>et al.</i> , 2002 Kang <i>et al.</i> , 2012
AF435632 AF435634	2	Oceanía	Vanuatu	Putaporntip <i>et al.</i> , 2002

Anexo 2. Números de acceso, regiones y país de las secuencias de *pvama1_{I-II}* utilizadas en este estudio.

Número de acceso NCBI	N	Región	País	Referencia
EU346015-EU346087	73	Suramérica	Venezuela	Ord <i>et al.</i> , 2008
JF682785-JF682790 JX624732-JX624760	101	Medio Oriente	Irán	Motevalli <i>et al.</i> , no publicado Zakeri <i>et al.</i> , 2000
EF218679-EF218701	23	Sur de Asia	Sri Lanka	Gunasekera <i>et al.</i> 2007
EF025187-EF025197 EU282774-EU282822	60	Sur de Asia	India	Rajesh <i>et al.</i> 2007 Thakur <i>et al.</i> 2008
FJ784891-FJ785121	231	Sureste de Asia	Tailandia	Putaporntip <i>et al.</i> 2009
KX495505-KX495577	73	Sureste de Asia	China	Zhu <i>et al.</i> , 2016
KM230319-KM230384	66	Este de Asia	Corea	(Kang <i>et al.</i> 2015
KC702458 KC702402-KC702503	102	Oceanía	Papúa Nueva Guinea	Arnott <i>et al.</i> 2013

Anexo 3. Números de acceso, regiones y país de las secuencias de *pvcox1₅₁₀* utilizadas en este estudio.

Número de acceso NCBI	Región	País
KF638363	Norteamérica	México-CDC
KF638368	Norteamérica	México-CDC
KF638390	Norteamérica	México-CDC
AY791549	Centroamérica	-
AY791550	Centroamérica	-
KF668383	Centroamérica	CDC
KF668402	Centroamérica	Belice-CDC
KF668385	Centroamérica	Guatemala-CDC
KF668403	Centroamérica	Guatemala-CDC
AY791543	Centroamérica	El Salvador
AY791551	Centroamérica	El Salvador
KF668372	Centroamérica	El Salvador-CDC
KF668377	Centroamérica	El Salvador-CDC
KF668384	Centroamérica	El Salvador-CDC
KF668396	Centroamérica	El Salvador-CDC
AY791545 – 6	Centroamérica	Honduras
KF668364	Centroamérica	Honduras-CDC
KF668371	Centroamérica	Honduras-CDC
KF668374	Centroamérica	Honduras-CDC
KF668376	Centroamérica	Honduras-CDC
KF668378	Centroamérica	Honduras-CDC
KF668388	Centroamérica	Honduras-CDC
KF668393	Centroamérica	Honduras-CDC
KF668408	Centroamérica	Honduras-CDC
AY791541	Centroamérica	Nicaragua
KF668375	Centroamérica	Costa Rica-CDC
AY791542	Centroamérica	Panamá
AY791548	Centroamérica	Panamá
AY791544	Centroamérica	Rep. Dominicana
KF668373	Suramérica	Guyana Francesa-CDC
AY791529 – 30	Suramérica	Brasil
AY791532 – 33	Suramérica	Brasil
AY791535 – 40	Suramérica	Brasil
AY598074 – 96	Suramérica	Brasil
KC330558 – 614	Suramérica	Brasil
KC330633 – 63	Suramérica	Perú
AY791549	Suramérica	Colombia
KC330370 – 85	Suramérica	Colombia
KC330664 – 78	Suramérica	Venezuela
KF668369	Suramérica	Ecuador-CDC
KF668416	Suramérica	Ecuador-CDC
SRP081144	Europa	España

KF668380	África	CDC
KF668362	África	Sudan-CDC
KF668389	África	Uganda-CDC
JN788737	África	Angola
AY791528	África	Namibia
JN788766	África	Tanzania
JN788764	África	Ruanda
JN788763	África	Nigeria
JN788765	África	Sao Tome y Príncipe
AY791526 – 27	África	Mauritania
AY791517 – 25	África	Etiopía
KF668392	África	Etiopía-CDC
KF668401	África	Etiopía-CDC
KF668411	África	Etiopía-CDC
KF668423	África	Etiopía-CDC
KC330440 – 80	África	Madagascar
JN788738 – 62	África	Madagascar
KC330481 – 96	Medio Oriente	Turquía
JN788767 – 76	Medio Oriente	Turquía
AY791625 – 26	Medio Oriente	Irán
KF668381	Sur de Asia	Afganistán-CDC
KF668399	Sur de Asia	Afganistán-CDC
AY791607 – 22	Sur de Asia	India
AY791624	Sur de Asia	India
AY791628	Sur de Asia	India
AY791630	Sur de Asia	India
KF668361	Sur de Asia	India-CDC
KF668367	Sur de Asia	India-CDC
KF668370	Sur de Asia	India-CDC
KF668379	Sur de Asia	India-CDC
KF668382	Sur de Asia	India-CDC
KF668407	Sur de Asia	India-CDC
KF668412 – 13	Sur de Asia	India-CDC
KF668421	Sur de Asia	India-CDC
KF668424 – 29	Sur de Asia	India-CDC
AY791557	Sur de Asia	Sri Lanka
AY791629	Sur de Asia	Pakistán
KC330406 – 39	Sur de Asia	Pakistán
KC330386 – 405	Sur de Asia	Pakistán
AY598109 – 15	Sur de Asia	Bangladesh
AY791691	Sur de Asia	Bangladesh
KC330514 – 32	Sureste de Asia	Camboya
JQ240399	Sureste de Asia	Myanmar
JQ 240400 – 29	Sureste de Asia	Myanmar
AY598035 – 73	Sureste de Asia	Tailandia

AY791583	Sureste de Asia	Tailandia
AY791556	Sureste de Asia	Tailandia
AY791558 – 60	Sureste de Asia	Tailandia
KF668400	Sureste de Asia	Tailandia-CDC
AY598121 – 27	Sureste de Asia	Vietnam
AY791581	Sureste de Asia	Vietnam
AY791584	Sureste de Asia	Vietnam
AY791571	Sureste de Asia	Filipinas
KC330533 – 57	Sureste de Asia	Indonesia
AY598098 – 108	Sureste de Asia	Indonesia
AY791552	Sureste de Asia	Indonesia
AY791562 – 63	Sureste de Asia	Indonesia
AY791567	Sureste de Asia	Indonesia
AY791572	Sureste de Asia	Indonesia
AY791576 – 80	Sureste de Asia	Indonesia
AY791582	Sureste de Asia	Indonesia
AY791555	Sureste de Asia	Borneo
AY791573	Sureste de Asia	Timor del Este
AY598128 – 39	Este de Asia	China
AY791585 – 606	Este de Asia	China
JQ240331 – 66	Este de Asia	China
JQ240370 – 95	Este de Asia	China
KC330497 – 99	Este de Asia	Corea del Sur
KC330500 – 13	Este de Asia	Corea del Sur
AB550270 – 79	Este de Asia	Corea del Sur
KF668404	Este de Asia	Corea-CDC
AY791554	Este de Asia	Corea del Norte
AY791561	Oceanía	Melanesia
AY791565 – 66	Oceanía	Melanesia
AY791568 – 70	Oceanía	Melanesia
AY791574	Oceanía	Melanesia
AY791692	Oceanía	Melanesia
KF668410	Oceanía	Vanuatu-CDC
AY598116 – 18	Oceanía	Islas Salomón
AY791564	Oceanía	Islas Salomón
AY791631 – 90	Oceanía	Papúa Nueva Guinea
KF668387	Oceanía	Papúa Nueva Guinea-CDC
KF668391	Oceanía	Papúa Nueva Guinea-CDC

Nota. Las tres secuencias de Europa (España) se ensamblaron a partir de las lecturas subidas al GenBank con número de acceso SRP081144 por Gelabert *et al.*, 2016.

8. Referencias.

- Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M. *Plasmodium knowlesi*: the emerging zoonotic malaria parasite. *Acta Trop.* 2013; 125(2): 191–201.
- Arnott A, Barry AE, Reeder JC. Understanding the population genetics of *Plasmodium vivax* is essential for malaria control and elimination. *Malar J.* 2012; 11:14.
- Auburn S, Böhme U, Steinbiss S, Trimarsanto H, Hostetler J, Sanders M, *et al.* A new *Plasmodium vivax* reference sequence with improved assembly of the subtelomeres reveals abundance of *pir* genes. *Wellcome Open Res.* 2016; 1:4.
- Baniecki ML, Faust AL, Schaffner SF, Park DJ, Galinsky RF, Daniels RF, *et al.*, Development of a single nucleotide polymorphism barcode to genotype *Plasmodium vivax* infections. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9(3):e0003539.
- Barry AE, Waltmann A, Koepfli C, Barnadas C, Mueller I. Uncovering the transmission dynamics of *Plasmodium vivax* using population genetics. *Pathog Glob Health.* 2015; 109(3):142–52.
- Bassat Q, Velarde M, Mueller I, Lin J, Leslie T, Wongsrichanalai C, *et al.* Key knowledge gaps for *Plasmodium vivax* control and elimination. *Am J Trop Med Hyg.* 2016; 95(6):62–71.
- Batista CL, Barbosa S, Da Silva BM, Viana SA, Ferreira MU. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* over time and space: a community-based study in rural Amazonia. *Parasitology.* 2014; 142(2):374–84.
- Battle KE, Gething PW, Elyazar IR, Moyes CL, Sinka ME, Howes RE, *et al.* The global public health significance of *Plasmodium vivax*. *Adv Parasitol.* 2012; 80:1–111.
- Bausa K, Malinauskas T, Pfander C, Anar B, Jones EY, Billker O, *et al.* Efficacy of a *Plasmodium vivax* malaria vaccine using ChAd63 and modified vaccinia Ankara expressing thrombospondin-related anonymous protein as assessed with transgenic *Plasmodium berghei* parasites. *Infect Immun.* 2014; 82(3):1277–86.
- Bennett JW, Yadava A, Tosh D, Sattabongkot J, Komisar J, Ware LA, *et al.* Phase 1/2a Trial of *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Candidate VMP001/AS01B in Malaria-Naive Adults: Safety, Immunogenicity, and Efficacy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(2):e0004423.
- Betanzos-Reyes AF. La malaria en México. Progresos y desafíos hacia su eliminación. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2011; 68(2):159–168.
- Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. 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. *J Exp Med.* 1990; 172(1):379–82.
- Bouillet LÉ, Dias MO, Dorigo NA, Moura AD, Russell B, Nosten F, *et al.* Long-term humoral and cellular immune responses elicited by a heterologous *Plasmodium vivax* apical membrane

- antigen 1 protein prime/adenovirus boost immunization protocol. *Infect Immun*. 2011; 79(9):3642–52.
- Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clin Microbiol Rev*. 2011; 24(2):377–410.
 - Bowman ZS, Oatis JE Jr, Whelan JL, Jollow DJ, McMillan DC. Primaquine-induced haemolytic anemia: susceptibility of normal versus glutathione-depleted rat erythrocytes to 5-hydroxyprimaquine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004; 309(1):79–85.
 - Brito CF, Ferreira MU. Molecular markers and genetic diversity of *Plasmodium vivax*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011; 106(1):12–26.
 - Bueno LL, Lobo FP, Morais CG, Mourão LC, de Ávila RA, Soares IS, *et al*. Identification of a highly antigenic linear B cell epitope within *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1). *PLoS One*. 2011; 6(6):e21289.
 - Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, Caler E, *et al*. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature*. 2008; 455(7214):757–63.
 - Carlton JM, Das A, Escalante AA. Genomics, population genetics and evolutionary history of *Plasmodium vivax*. *Adv Parasitol*. 2013; 81:203–22.
 - Carlton JM, Sina BJ, Adams JH. Why is *Plasmodium vivax* a neglected tropical disease? *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(6):e1160.
 - Carter, R. Speculations on the origins of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol*. 2003; 19(5):214–219.
 - Cassiano GC, Furini AA, Capobianco MP, Storti-Melo LM, Almeida ME, Barbosa DR, *et al*. Immunogenetic markers associated with a naturally acquired humoral immune response against an N-terminal antigen of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 (PvMSP-1). *Malar J*. 2016; 15:306.
 - CENETEC. (3 de noviembre de 2016). Deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa. Tamizaje, diagnóstico y tratamiento. 1°, 2° y tercer nivel de atención. Recuperado de: <http://www.cenetec.salud.gob.mx/interior/catalogoMaestroGPC.html>
 - Cerritos R, González-Cerón L, Nettel JA, Wegier A. Genetic structure of *Plasmodium vivax* using the merozoite surface protein 1 icb5-6 fragment reveals new hybrid haplotypes in southern Mexico. *Malar J*. 2014; 13:35.
 - Cheeseman IH, Miller BA, Nair S, Nkhoma S, Tan A, Al Saai S, *et al*. A major genome region underlying artemisinin resistance in malaria. *Science*. 2012; 336(6077):79–82.
 - Chen SB, Wang Y, Kassegne K, Xu B, Shen HM, Chen JH. Whole-genome sequencing of a *Plasmodium vivax* clinical isolate exhibits geographical characteristics and high genetic variation in China-Myanmar border area. *BMC Genomics*. 2017; 18(1):131.

- Chenet SM, Tapia LL, Escalante AA, Durand S, Lucas C, Bacon DJ. Genetic diversity and population structure of genes encoding vaccine candidate antigens of *Plasmodium vivax*. *Malar J*. 2012; 11:68.
- Cheng Y, Wang Y, Ito D, Kong DH, Ha KS, Chen JH, *et al*. The *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 paralog is a novel erythrocyte-binding ligand of *P. vivax*. *Infect Immun*. 2013; 81(5):1585–95.
- Clancy S. Genetic mutation. *Nature Education*. 2008; 1(1):187.
- Cornejo OE, Escalante AA. The origin and age of *Plasmodium vivax*. *Trends Parasitol*. 2006; 22:558–563.
- Cornejo OE, Fisher D, Escalante AA. Genome-wide patterns of genetic polymorphism and signatures of selection in *Plasmodium vivax*. *Genome Biol Evol*. 2014; 7(1):106–19.
- Cowell AN, Valdivia HO, Bishop DK, Winzeler EA. Exploration of *Plasmodium vivax* transmission dynamics and recurrent infections in the Peruvian Amazon using whole genome sequencing. *Genome Med*. 2018; 10(1):52.
- Cowman AF, Berry D, Baum J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J Cell Biol*. 2012; 198(6):961–71.
- Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vector. *Parasit Vectors*. 2010; 3(1):5.
- Cox FE. History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15(4):595–612.
- Culleton R, Carter R. African *Plasmodium vivax*: distribution and origins. *Int J Parasitol*. 2012; 42(12):1091–1097.
- Culleton R, Coban C, Zeyrek FY, Cravo P, Kaneko A, Randrianarivelojosia M, *et al*. The origins of African *Plasmodium vivax*; insights from mitochondrial genome sequencing. *PLoS One*. 2011; 6(12):e29137.
- Daniels RF, Rice BL, Daniels NM, Volkman SK, Hartl DL. The utility of genomic data for *Plasmodium vivax* population surveillance. *Pathog Glob Health*. 2015; 109(3):153–61.
- Daniels R, Volkman SK, Milner DA, Mahesh N, Neafsey DE, Park DJ, *et al*. A general SNP-based molecular barcode for *Plasmodium falciparum* identification and tracking. *Malar J*. 2008; 7:223.
- de Araujo FC, de Rezende AM, Fontes CJ, Carvalho LH, Alves de Brito CF. Multiple-clone activation of hypnozoites is the leading cause of relapse in *Plasmodium vivax*. *PLoS One*. 2012; 7(11):e49871.
- de Cassan SC, Shakri AR, Llewellyn D, Elias SC, Cho JS, Goodman AL, *et al*. Preclinical Assessment of Viral Vectored and Protein Vaccines Targeting the Duffy-Binding Protein Region II of *Plasmodium Vivax*. *Front Immunol*. 2015; 6:348.

- Delgado-Ratto C, Soto-Calle VE, Van den Eede P, Gamboa D, Rosas A, Abatih EN, *et al.* Population structure and spatio-temporal transmission dynamics of *Plasmodium vivax* after radical cure treatment in a rural village of the Peruvian Amazon. *Malar J.* 2014; 13:8.
- del Portillo HA, Longacre S, Khouri E, David PH. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88(9):4030–4.
- de Oliveira TC, Rodrigues PT, Menezes MJ, Gonçalves-Lopes RM, Bastos MS, Lima NF, *et al.* Genome-wide diversity and differentiation in New World populations of the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; 11(7):e0005824.
- Dharia NV, Bright AT, Westenberg SJ, Barnes SW, Batalov S, Kuhlen K, *et al.* Whole-genome sequencing and microarray analysis of ex vivo *Plasmodium vivax* reveal selective pressure on putative drug resistance genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107(46):20045–50.
- Dirección General de Epidemiología. (26 de abril de 2017) Boletín epidemiológico. Recuperado de: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/historico-boletin-epidemiologico>
- Escalante AA, Cornejo OE, Freeland DE, Poe AC, Durrego E, Collins WE, *et al.* 2005. A monkey's tale: the origin of *Plasmodium vivax* as a human malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102:1980–1985.
- Escalante AA, Freeland DE, Collins WE, Lal AA. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(14):8124–9.
- Espinosa AM, Sierra AY, Barrero CA, Cepeda LA, Cantor EM, Lombo TB, *et al.* Expression, polymorphism analysis, reticulocyte binding and serological reactivity of two *Plasmodium vivax* MSP-1 protein recombinant fragments. *Vaccine.* 2003; 21(11-12):1033–43.
- Farrar J. *Manson's Tropical Diseases.* 2013; Elsevier. London.
- Feagin JE, Mericle BL, Wernwr E, Morris M. Identification of additional rRNA fragments encoded by the *Plasmodium falciparum* 6 kb element. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25(2):438–46.
- Feng H, Zheng L, Zhu X, Wang G, Pan Y, Li Y, *et al.* Genetic diversity of transmission-blocking vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 in *Plasmodium vivax* isolates from Yunnan Province, China. *Parasit Vectors.* 2011; 4:224.
- Ferreira MU, Karunaweera ND, da Silva-Nunes M, da Silva NS, Wirth DF, Hertl DL. Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in rural Amazonia. *J Infect Dis.* 2007; 195(8):1218–26.
- Ferreira MU, Ribeiro WL, Tonon AP, Kawamoto F, Rich SM. Sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-1 (MSP-1) of *Plasmodium falciparum*. *Gene.* 2003; 304:65–75.
- Fisher RA. *The genetic theory of natural selection.* 1932; Oxford University Press. London.

- Flores-Alanis A, González-Cerón L, Santillán F, Ximenes C, Sandoval MA, Cerritos R. Temporal genetic changes in *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 over 19 years of transmission in southern Mexico. *Parasit Vectors*. 2017; 10(1):217.
- Fola AA, Nate E, Abby Harrison GL, Barnadas C, Hetzel MW, *et al.* Nationwide genetic surveillance of *Plasmodium vivax* in Papua New Guinea reveals heterogeneous transmission dynamics and routes of migration amongst subdivided populations. *Infect Genet Evol*. 2018; 58:83–95.
- Futuyma D. *Evolutionary Biology*. 1998; Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.
- Gelabert P, Sandoval-Velasco M, Olalde I, Fregel R, Rieux A, Escosa R, *et al.* Mitochondrial DNA from the eradicated European *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* from 70-year-old slides from the Ebro Delta in Spain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016; 113(41):11495–11500.
- Gerold P, Schofield L, Blackman MJ, Holder AA, Schwarz RT. Structural analysis of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the merozoite surface proteins-1 and -2 of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1996; 75(2):131–43.
- Gething PW, Elyazar IR, Moyes CL, Smith DL, Battle KE, Guerra CA, *et al.* A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(9):e1814.
- Gillespie JH. *Population Genetics*. 1998; The Johns Hopkins University Press. Baltimore and London.
- Gomez JC, McNamara DT, Bockarie MJ, Baird JK, Carlton JM, Zimmermann PA. Identification of a polymorphic *Plasmodium vivax* microsatellites marker. *Am J Trop Med Hyg*. 2003; 69(4):377–9.
- González-Cerón L, Alvarado-Delgado A, Martínez-Barnette J, Rodríguez MH, Ovilla-Muñoz M, Pérez F, *et al.* Sequence variation of ookinete surface proteins Pvs25 and Pvs28 of *Plasmodium vivax* isolates from southern Mexico and their association to local anophelines infectivity. *Infect Genet Evol*. 2010; 10(5):645–54.
- González-Cerón L, Cerritos R, Corzo-Mancilla J, Santillán F. Diversity and evolutionary genetics of the three major *Plasmodium vivax* merozoite genes participating in reticulocyte invasion in southern Mexico. *Parasit Vectors*. 2015; 8(1):651.
- González-Cerón L, Martínez-Barnette J, Montero-Solís C, Santillán F, Soto AM, Rodríguez MH, *et al.* Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax* in Latin America: polymorphism and evolutionary relationships of the circumsporozoite gene. *Malar J*. 2013; 12:243.
- González-Cerón L, Montoya A, Corzo-Gómez JC, Cerritos R, Santillán F, Sandoval MA. Genetic diversity and natural selection of *Plasmodium vivax* multi-drug resistant gene (*pvmdr1*) in Mesoamerica. *Malar J*. 2017; 16(1):261.
- Gonzalez-Ceron L, Rodriguez MH, Nettel JA, Villarreal C, Kain K, Hernandez, JE. Differential susceptibilities of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* to infection with

- coindigenous *Plasmodium vivax* variants VK210 and VK247 in Southern Mexico. *Infect Immun.* 1999; 67(1):410–2.
- Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJ, Targett GA. Malaria. *Lancet.* 2005; 365(9469):1487–98.
 - Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin EC, Gelbart WM. An introduction to genetic analysis. 2000; W. H. Freeman. New York.
 - Grynberg P, Fontes CJ, Hughes AL, Braga EM. Polymorphism at the apical membrane antigen 1 locus reflects the world population history of *Plasmodium vivax*. *BMC Evol Biol.* 2008; 8:123.
 - Gunawardena S, Ferreira MU, Kapilananda GM, Wirth DF, Karunaweera ND. The Sri Lanka paradox: high genetic diversity in *Plasmodium vivax* populations despite decreasing levels of malaria transmission. *Parasitology.* 2014; 141(7):880–90.
 - Gunawardena S, Karunaweera ND, Ferreira MU, Phone-Kyaw M, Pollack M, Alifrangis M, *et al.* Geographic structure of *Plasmodium vivax*: microsatellite analysis of parasite populations of Sri Lanka, Myanmar, and Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 82(2):235–42.
 - Hamilton MB. Population Genetics. 2009; Wiley-Black Well. Oxford.
 - Han HJ, Park SG, Kim SH, Hwang SY, Han J, Traicoff J, *et al.* Epidermal growth factor-like motifs 1 and 2 of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 are critical domains in erythrocyte invasion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 320(2):563–70.
 - Hernandez-Martinez MÁ, Escalante AA, Arévalo-Herrera M, Herrera S. Antigenic diversity of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein in parasite isolates of Western Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 84(2):51–7.
 - Hisaeda H, Stowers AW, Tsuboi T, Collins WE, Sattabongkot JS, Suwanabun N, *et al.* Antibodies to malaria vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 completely block the ability of *Plasmodium vivax* to infect mosquitoes. *Infect Immun.* 2000; 68(12):6618–23.
 - Holder AA, Blackman MJ, Burghaus PA, Chappel JA, Ling IT, McCallum-Deighton N, *et al.* A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992; 87(3):37–42.
 - Howes RE, Dewi M, Piel FB, Monteiro WM, Battle KE, Messina JP, *et al.* Spatial distribution of G6PD deficiency variants across malaria-endemic regions. *Malar J.* 2013; 12:418.
 - Howes RE, Patil AP, Piel FB, Nyangiri OA, Kabaria CW, Gething PW, *et al.* The global distribution of the Duffy blood group. *Nat Commun.* 2011; 2:226.
 - Hupal DN, Luo Z, Melnikov A, Sutton PL, Rogov P, Escalante A, *et al.* Population genomics studies identify signatures of global dispersal and drug resistance in *Plasmodium vivax*. *Nat Genet.* 2016; 48(8):953–958.
 - Imwong M, Snounou G, Pukrittayakamee S, Tanomsing N, Kim JR, Nandy A, *et al.* Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from activation of heterologous hypnozoites. *J Infect Dis.* 2007; 195(7):927–33.

- Imwong M, Sudimack D, Pukrittayakamee S, Osorio L, Carlton JM, White NJ, *et al.* Microsatellite variation, repeat array length, and population history of *Plasmodium vivax*. *Mol Biol Evol.* 2006; 23(5):1016–8.
- Iwagami M, Hwang S-Y, Kim S-H, Park S-J, Lee G-Y, Matsumoto-Takahashi ELA, *et al.* Microsatellite DNA analysis revealed a drastic genetic change of *Plasmodium vivax* population in the Republic of Korea during 2002 and 2003. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(10):e2522.
- Iyer J, Grüner AC, Rénia L, Snounou G, Preiser PR. Invasion of host cells by malaria parasites: a tale of two proteins families. *Mol Microbiol.* 2007; 65(2):231–49.
- Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki T, Ferreira MU, Kanbara H, Hughes AL. Mitochondrial genome sequences support ancient population expansion in *Plasmodium vivax*. *Mol Biol Evol.* 2005; 22:1733–1739.
- Janse CJ, Van der Klooster PF, Van der Kaay HJ, Van der Ploeg M, Overdulve JP. Rapid repeated DNA replication during microgametogenesis and DNA synthesis in young zygotes of *Plasmodium berghei*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986; 80(1):154–7.
- Jennison C, Arnott A, Tessier N, Tavul L, Koepfli C, Felger I, *et al.* *Plasmodium vivax* populations are more genetically diverse and less structured than sympatric *Plasmodium falciparum* populations. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9(4):e0003634.
- Joy DA, Gonzalez-Ceron L, Carlton JM, Gueyes A, Fay M, McCutchan TF, *et al.* Local adaptation and vector-mediated population structure in *Plasmodium vivax* malaria. *Mol Biol Evol.* 2008; 25(6):1245–52.
- Kain KC, Brown AE, Webster HK, Wirtz RA, Keystone JS, Rodriguez MH, *et al.* Circumsporozoite genotyping of global isolates of *Plasmodium vivax* from dried blood specimens. *J Clin Microbiol.* 1992; 30(7):1863–6.
- Kang JM, Ju HL, Kang YM, Lee DH, Moon SU, Sohn WM, *et al.* Genetic polymorphism and natural selection in the C-terminal 42 kDa region of merozoite surface protein-1 among *Plasmodium vivax* Korean isolates. *Malar J.* 2012; 11:206.
- Kim JR, Nandy A, Maji AK, Addy M, Dondrop AM, Day NP, *et al.* Genotyping of *Plasmodium vivax* reveals both short and long latency relapse patterns in Kolkata. *PLoS One.* 2012; 7(7):e39645.
- Koepfli C, Rodrigues PT, Antao T, Orjuela-Sánchez P, Van den Eede P, Gamboa D, *et al.* *Plasmodium vivax* diversity and population structure across four continents. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9(6):e0003872.
- Koepfli C, Ross A, Kiniboro B, Smith TA, Zimmerman PA, Siba P, *et al.* Multiplicity and diversity of *Plasmodium vivax* infections in a highly endemic region in Papua New Guinea. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(12):e1424.

- Leclerc MC, Durand P, Gauthier C, Patot S, Billotte N, Menegon M, *et al.* Meager genetic variability of the human malaria agent *Plasmodium vivax*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(40):14455–60.
- Li W. *Molecular Evolution*. 1997; Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.
- Loewe L. Genetic mutation. *Nature Education*. 2008; 1(1):113.
- Longley RJ, White MT, Takashima E, Morita M, Kanoi BN, Li Wai Suen CSN, *et al.*, Naturally acquired antibody response to more than 300 *Plasmodium vivax* proteins in three geographic regions. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11(9):e0005888.
- McCutchan TF, Dame JB, Miller LH, Barnwell J. Evolutionary relatedness of *Plasmodium* species as determined by the structure of DNA. *Science*. 1984; 225(4664):808–11.
- McVean G, Awadalla P, Fearnhead P. A coalescent-based method for detecting and estimating recombination from gene sequences. *Genetics*. 2002; 160(3):1231–41.
- Medicines for Malaria Venture. (2018). The lifecycle of the malaria parasite. Recuperado de: <https://www.mmv.org/malaria-medicines/parasite-lifecycle>
- Melo GC, Monteiro WM, Siqueira AM, Silva SR, Magalhaes BM, Alencar AC, *et al.* Expression levels of *pv crt-o* and *pv mdr-1* are associated with chloroquine resistance and severe *Plasmodium vivax* malaria in patients of the Brazilian Amazon. *PLoS One*. 2014; 9(8):e105922.
- Menegon M, Durand P, Menard D, Legrand E, Picot S, Nour B, *et al.* Genetic diversity and population structure of *Plasmodium vivax* isolates from Sudan, Madagascar, French Guiana and Armenia. *Infect Genet Evol*. 2014; 27:244–9.
- Miao M, Yang Z, Patch H, Huang Y, Escalante AA, Cui L. *Plasmodium vivax* populations revisited: mitochondrial genomes of temperate strains in Asia suggest ancient population expansion. *BMC Evol Biol*. 2012; 12:22.
- Mu J, Awadalla P, Duan J, McGree KM, Keebler J, Seydel K *et al.* Genome-wide variation and identification of vaccine targets in the *Plasmodium falciparum* genome. *Nat Genet*. 2007; 39(1):125–30.
- Mu J, Joy DA, Duan J, Huang Y, Carlton J, Walker J, *et al.* Host switch leads to emergence of *Plasmodium vivax* malaria in humans. *Mol Biol Evol*. 2005; 22:1686–1693.
- Múfalo BC, Gentil F, Bargieri DY, Costa FT, Rodrigues MM, Soares IS. *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. *Microbes Infect*. 2008; 10(12–13):1266–73.
- Müller HJ. Some genetic aspects of sex. *Am Nat*. 1932; 66:121–131.
- Neafsey DE, Galinsky K, Jiang RH, Young L, Sykes SM, Saif S, *et al.* The malaria parasite *Plasmodium vivax* exhibits greater genetic diversity than *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet*. 2012; 44(9):1046–50.
- Nogueira PA, Alves FP, Fernandez-Becerra C, Pein O, Santos NR, Pereira da Silva LH, *et al.* A reduced risk of infection with *Plasmodium vivax* and clinical protection against malaria are

associated with antibodies against N terminus but not the C terminus of merozoite surface protein 1. *Infect Immun*. 2006; 74(5):2726–33.

- Ntumngia FB, King CL, Adams JH. Finding the sweet spots of inhibition: understanding the targets of a functional antibody against *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Int J Parasitol*. 2012; 42(12):1055–62.
- Olliaro PL, Barnwell JW, Barry A, Mendis K, Mueller I, Reeder JC, *et al*. Implications of *Plasmodium vivax* biology for control, elimination, and research. *Am J Trop Med Hyg*. 2016; 95(6):4– 4.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2017). Malaria Incidence Map. Recuperado de: http://ais.paho.org/hip/viz/malaria_surv_API_popup.asp
- Orjuela-Sánchez P, da Silva NS, da Silva-Nunes M, Ferreira MU. Recurrent parasitemias and population dynamics of *Plasmodium vivax* polymorphism in rural Amazonia. *Am J Trop Med Hyg*. 2009; 81(6):961–8.
- Orjuela-Sánchez P, Sá JM, Brandi MC, Rodrigues PT, Bastos MS, Amaratunga C, *et al*. Higher microsatellite diversity in *Plasmodium vivax* tan in sympatric *Plasmodium falciparum* populations in Pursat, Western Cambodia. *Exp Parasitol*. 2013; 134(3):318–26.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2009). World Malaria Report 2009. Recuperado de: https://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2009/en/
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (29 de noviembre de 2017). World Malaria Report 2017. Recuperado de: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/en/>
- Pacheco MA, Poe AC, Collins WE, Lal AA, Tanabe K, Kariuki SK, *et al*. A comparative study of the genetic diversity of the 42 kDa fragment of the merozoite surface protein 1 in *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Infect Genet Evol*. 2007; 7(2):180–7.
- Pacheco MA, Reid MJ, Schillaci MA, Lowenberger CA, Galdikas BM, Jones-Engel L, *et al*. The origin of malaria parasites in orangutans. *PLoS One*. 2012; 7(4):e34990.
- Paget-McNicol S, Saul A. Mutation rates in the dihydrofolate reductase gene of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*. 2001; 122(5):497–505.
- Parobek CM, Bailey JA, Hathaway NJ, Socheat D, Rogers WO, Juliano JJ. Differing patterns of selection and geospatial genetic diversity within two leading *Plasmodium vivax* candidate vaccine antigens. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(4):e2796.
- Pava Z, Noviyanti R, Handayuni I, Trimarsanto H, Trianty L, Burdam E, *et al*. Genetic micro-epidemiology of malaria in Papua Indonesia: extensive *P. vivax* diversity and a distinct subpopulation of asymptomatic *P. falciparum* infections. *PLoS One*. 2017; 12(5):e0177445.
- Pearson RD, Amato R, Auburn S, Miotto O, Almagro-Garcia J, Amaratunga C, *et al*. Genomic analysis of local variation and recent evolution in *Plasmodium vivax*. *Nat Genet*. 2016; 48(8):959–964.

- Putaporntip C, Jongwutiwes S, Sakihama N, Ferreira MU, Kho WG, Kaneko A, *et al.* Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(25):16348–53.
- Remarque EJ, Faber BW, Kocken CH, Thomas AW. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. *Trends Parasitol*. 2008; 24(2):74–84.
- Restrepo E, Imwong M, Rojas W, Carmona-Fonseca J, Maestre A. High genetic polymorphism of relapsing *Plasmodium vivax* in northwest Colombia. *Acta Trop*. 2011; 119(1):23–9.
- Rezende AM, Tarazona-Santos E, Fontes CJ, Souza JM, Couto AD, Carvalho LH, *et al.* Microsatellite loci: determining the genetic variability of *Plasmodium vivax*. *Trop Med Int Health*. 2010; 15(6):718–26.
- Riccio EK, Totino PR, Pratt-Riccio LR, Ennes-Vidal V, Soares IS, Rodrigues MM, *et al.* Cellular and humoral immune response against the *Plasmodium vivax* MSP-1₁₉ malaria vaccine candidate in individuals living in an endemic area in north-eastern Amazon region of Brazil. *Malar J*. 2013; 12:326.
- Rice BL, Acosta MM, Pacheco MA, Escalante AA. Merozoite Surface protein-3 as a genetic marker for epidemiologic studies in *Plasmodium vivax*: a cautionary note. *Malar J*. 2013; 12:228.
- Rodríguez LMH, Loyola EEG, Betanzos RAF, Villareal TC, Nielsen BD. Control focal del paludismo. *Gaceta Medica de México*. 1993; 130:313–319.
- Rodriguez MH, Gonzalez-Ceron L, Hernandez JE, Nettel JA, Villareal C, Wirtz RA. Different prevalences of *Plasmodium vivax* phenotypes VK210 and VK247 associated with the distribution of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* in Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 2000; 62(1):122–7.
- Rodrigues PT, Valdivia HO, de Oliveira TC, Alves JMP, Duarte AMRC, Cerutti-Junior C, *et al.* Human migration and the spread of malaria parasites to the New World. *Sci Rep*. 2018; 8(1):1993.
- Rosa DS, Iwai LK, Tzelepis F, Bargieri DY, Medeiros MA, Soares IS, *et al.* Immunogenicity of a recombinant protein containing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) and two human CD4+ T-cell epitopes administered to non-human primates (*Callithrix jacchus jacchus*). *Microbes Infect*. 2006; 8(8):2130–7.
- Sermwittayawong N, Singh B, Nishibuchi M, Sawangjaroen N, Vuddhakul V. Human *Plasmodium knowlesi* infection in Ranong province, southwestern border of Thailand. *Malar J*. 2012; 11: 36.
- Sharma VP. Current scenario of malaria India. *Parassitologia*. 1999; 41(1-3):349–353.
- Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamusul SS, Cox-Singh J, *et al.* A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*. 2004; 363(9414):1017–24.

- Sinka ME, Bangs MJ, Mangunis S, Chareonviriyaphap T, Patil AP, Temperley WH, *et al.* The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Asia-Pacific region: occurrence data, distribution maps and biomimics précis. *Parasit Vectors*. 2013; 4:89.
- Spanakos G, Snounou G, Peranidou D, Alifrangis M, Rosanas-Urgell A, Baka A, *et al.* Genetic spatiotemporal anatomy of *Plasmodium vivax* malaria episodes in Greece, 2009-2013. *Emerg Infect Dis*. 2018; 24(3):541–548.
- Sutton PL, Luo Z, Divis PCS, Friedrich VK, Conway DJ, Singh B, *et al.* Characterizing the genetic diversity of the monkey malaria parasite *Plasmodium cynomolgi*. *Infect Genet Evol*. 2016; 40:243–252.
- Tachibana S, Sullivan SA, Kawai S, Nakamura S, Kim HR, Goto N, *et al.* *Plasmodium cynomolgi* genome sequences provide insight into *Plasmodium vivax* and the monkey malaria clade. *Nat Genet*. 2012; 44(9):1051–5.
- Taylor JE, Pacheco MA, Bacon DJ, Beg MA, Machado RL, Fairhurst RM, *et al.* The evolutionary history of *Plasmodium vivax* as inferred from mitochondrial genomes: Parasite genetic diversity in the Americas. *Mol Biol Evol*. 2013; 30(9):2050–64.
- Tomas AM, Margos G, Dimopoulos G, Van Lin LH, De Koning-Ward TF, Sinha R, *et al.* P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions. *EMBO J*. 2001; 20(15):3975–3983.
- Van den Eede P, Van der Auwera G, Delgado C, Huyse T, Soto-Calle VE, Gamboa D, *et al.* Multilocus genotyping high heterogeneity and strong population structure of the *Plasmodium vivax* population in the Peruvian Amazon. *Malar J*. 2010; 9:151.
- Vector Base. (2018). Recuperado de: <https://www.vectorbase.org/organisms/anopheles-darlingi>
- Verhave JP. Experimental, therapeutic and natural transmission of *Plasmodium vivax* tertian malaria: scientific and anecdotal data on the history of Dutch malaria studies. *Parasit Vectors*. 2013; 6(1):19.
- Volkam SK, Sabeti PC, DeCaprio D, Neafsey DE, Schaffner SF, Milner DA Jr, *et al.* A genome-wide map of diversity in *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet*. 2007; 39(1):113–9.
- Waltmann A, Koepfli C, Tessier N, Karl S, Fola A, Darcy AW, *et al.* Increasingly inbred and fragmented populations of *Plasmodium vivax* associated with the eastward decline in malaria transmission the Southwest Pacific. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12(1):e0006146.
- Weedall GD, Conway DJ. Detecting signatures of balancing selection to identify targets of anti-parasite immunity. *Trends Parasitol*. 2010; 26(7):363–9.
- Wertheimer SP, Barnwell JW. *Plasmodium vivax* interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: identification of a parasite receptor-like protein. *Exp Parasitol*. 1989; 69(4):340–350.

- White NJ. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J.* 2011; 10:297.
- Wickramarachchi T, Illeperuma RJ, Perera L, Bandara S, Holm I, Longacre S, *et al.* Comparison of naturally acquired antibody response against C-terminal processing products of *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 under low transmission and unstable malaria conditions in Sri Lanka. *Int J Parasitol.* 2007; 37(2):199–208.
- Wilson RJ, Williamson DH. Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997; 61(1):1–16.
- Winter DJ, Pacheco MA, Vallejo AF, Schwartz RS, Arevalo-Herrera M, Herrera S, *et al.* Whole genome sequencing of field isolates reveals extensive genetic diversity in *Plasmodium vivax* from Colombia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9(12):e0004252.
- Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sumatihardja A, Wernsdorfer WH. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77(6):119–27.
- Wright GJ, Rayner JC. *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion: combining function with immune evasion. *PLoS Pathog.* 2014; 10(3):e10003943.
- Xia H, Fang Q, Jangpatarapongsa K, Zhiyong T, Cui L, Li B, *et al.* A comparative study of natural immune responses against *Plasmodium vivax* C-terminal merozoite surface protein-1 (PvMSP-1) and apical membrane antigen-1 (PvAMA-1) in two endemic settings. *EXCLI J.* 2015; 14:926–34.
- Zhou X, Tambo E, Su J, Fang Q, Ruan W, Chen JH, *et al.* Genetic diversity and natural selection in 42 kDa region of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 from China-Myanmar endemic border. *Korean J Parasitol.* 2017; 55(5):473–480.
- Zimmerman PA, Ferreira MU, Howes RE, Mercereau-Puijalon O. Red blood cell polymorphism and susceptibility to *Plasmodium vivax*. *Adv Parasitol.* 2013; 81:27–76.