
CARACTERIZACIÓN Y AISLAMIENTO DEL GEN CYRPA RELACIONADO CON MALARIA

Characterization and isolation of the *CyRPA*
gene related to malaria.

JOSÉ CEBRIÁN CARMONA
GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

TUTORES:
CONCEPCIÓN M^a MESA VALLE
JOSÉ ANTONIO GARRIDO CÁRDENAS



UNIVERSIDAD
DE ALMERÍA

Agradecimientos.

El primer contacto con la investigación y la ciencia se trata en la mayoría de los casos, del trabajo de fin de grado. Proyecto que es apasionante e ilusionante, pero a la vez duro y laborioso.

En estos meses en los que he comenzado mi carrera como científico, en primer lugar quiero y debo agradecer a D. José Antonio Garrido Cárdenas y D.^a Concepción M^a Mesa Valle por todo lo que han hecho por mí, darme la oportunidad de empezar en este mundo. Gracias a vosotros por hacerme sentir importante en todo momento, no he podido tener mejores directores, ojalá esto solo sea el principio de una larga historia.

Gracias a Carlos Martín Sedano, por ser ese amigo que toda persona necesita, por las experiencias que nos han enriquecido y nos han convertido en lo que somos.

Gracias a Laura López Jóver, que me ha enseñado a soñar en grande, que los problemas no son problemas, si no circunstancias a resolver, por ser esa sonrisa diaria.

Gracias a mis padres, mi hermano, mis abuelos, Tati y Tuti. Sois los verdaderos promotores de esto, sin vosotros esto nunca habría sido posible. Con vuestro apoyo incondicional, amor y cariño me habéis enseñado lo que no se enseña en las aulas.

Para terminar, gracias a Paqui Martínez Antequera, por no dejar que me caiga nunca, haberme agarrado de la mano estos cuatro años y construir este difícil camino, por hacer algo impensable hasta la fecha, que sea capaz de creer en mi mismo.

“Nadie puede construir un mundo mejor sin mejorar a las personas. Cada uno debe trabajar para su propia mejora”

(Marie Curie)

RESUMEN.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) tiene una serie de objetivos de desarrollo del milenio. Dentro de estos objetivos, se encuentran combatir enfermedades como el VIH y la malaria, siendo una de las más extendida por todo el mundo, sobre todo en regiones de África, América del Sur y algunas zonas de Asia. Esta enfermedad se caracteriza por su elevada tasa de mortalidad al año producida por protozoos parásitos del género *Plasmodium*. Existen diferentes especies de *Plasmodium*, siendo las de mayor interés *P. falciparum*, por su alta tasa de mortalidad, y *P. vivax*, por su mayor distribución geográfica y su aumento en el número de casos y en la gravedad de la enfermedad en los últimos años. Por todo ello son muchos los científicos que dirigen sus investigaciones a buscar una vacuna eficaz contra la malaria. A pesar de los esfuerzos no existe en la actualidad una vacuna frente a estos protozoos parásitos, debido a factores como la amplia capacidad de estos protozoos parásitos para generar polimorfismos en su secuencia. En la presente investigación, se ha trabajado con *P. vivax*. Se consiguió secuenciar un gen que en especies homólogas codifica una proteína que posee un alto poder inmunogénico, el gen *CyRPA*. Éste podría ser utilizado en un futuro como la base para una vacuna capaz de reducir la malaria ocasionada por *P. vivax*.

ABSTRACT.

The World Health Organization (WHO) has several millennium development goals. Within these objectives, are fighting diseases such as HIV and malaria, the latter being widespread throughout the world, especially in regions of Africa, South America and Asia. This disease is characterized by the high rate of mortality per year produced by a protozoan parasite of the genus *Plasmodium*. There are different species of *Plasmodium*, being the most interesting *P. falciparum*, with a high mortality rate, and *P. vivax*, because it is widespread throughout the world, with the exception of Africa, and its recent increase in the number of cases. Actually, there is a big number of researchers in the search for vaccines that are capable of reducing these parasitic protozoa. Currently, no vaccine capable of this has been found, due to factors such as the broad capacity of these parasitic protozoa to generate polymorphisms in their sequence. In the present investigation, we have worked with *P. vivax*. It was possible to sequence a gene that encodes for a protein with high immunogenic power in homologous species, the *CyRPA* gene. This could be used in the future as the basis for a vaccine capable of reducing malaria caused by *P. vivax*.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 MALARIA.....	6
1.1.1 <i>Conceptos generales</i>	6
1.1.2 <i>Ciclo de vida de Plasmodium</i>	7
1.2 PLASMODIUM VIVAX.....	9
1.2.1 <i>Conceptos generales</i>	9
1.2.2 <i>Plasmodium vivax en Sudamérica</i>	10
1.3 PRINCIPALES ESTRATEGIAS LLEVADAS A CABO PARA REDUCIR LA MALARIA.....	10
1.4 PRINCIPALES INCONVENIENTES PARA REDUCIR LA MALARIA.....	11
1.5 VACUNAS.....	12
1.5.1 <i>Vacunas preeritrocíticas</i>	13
1.5.2 <i>Vacunas eritrocíticas</i>	14
1.5.3 <i>Vacunas desarrolladas contra Plasmodium vivax</i>	14
1.6 CYRPA.....	15
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
3.1 MATERIAL.....	17
3.1.1 <i>Material</i>	17
3.1.2 <i>Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR</i>	17
3.2 MÉTODOS.....	17
3.2.1 <i>Extracción de ADN</i>	17
3.2.2 <i>Herramientas bioinformáticas</i>	18
3.2.3 <i>Cuantificación de la concentración de ADN</i>	18
3.2.4 <i>Técnicas de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). PCR cuantitativa</i>	19
3.2.5 <i>Purificación de los productos de PCR</i>	21
3.2.6 <i>Secuenciación de los ácidos nucleicos</i>	21
3.2.7 <i>Precipitación de los productos de la reacción de secuenciación</i>	21
3.2.8 <i>Reconstitución de los cebadores internos</i>	22
3.2.9 <i>Ensamblaje de las secuencias obtenidas</i>	22
3.2.10 <i>Análisis cladístico de las secuencias</i>	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
4.1 IDENTIFICACIÓN DE PLASMODIUM VIVAX EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	23
4.2 OBTENCIÓN DEL GEN CYRPA.....	24
4.3 ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE ADN.....	26
4.4 ANÁLISIS DEL ALINEAMIENTO.....	28
4.4.1 <i>Análisis de variación entre secuencias</i>	28
4.4.2 <i>Análisis de similitud</i>	29
4.4.3 <i>Análisis filogenético</i>	30
4.5 CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA GENÓMICA DEL GEN CYRPA EN P. VIVAX.....	33
4.6 CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA PROTEICA DE CYRPA EN P. VIVAX.....	35
6. CONCLUSIONES.....	36
7. BIBLIOGRAFÍA.....	37

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 MALARIA.

1.1.1 Conceptos generales.

La malaria es una enfermedad producida por un protozoo parásito del género *Plasmodium*. Según el último informe de la Organización Mundial de la Salud, cada año afecta a 215 millones de personas y ocasiona alrededor de 500.000 muertes («WHO. World Malaria Report 2014. Available online via http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/wmr-2014-no-profiles.pdf?ua=1», 2014). En 2017, el 92% de los casos y el 93% de los fallecimientos por esta enfermedad se produjeron en el continente Africano, y en menor medida, en algunas regiones de Sudamérica y el sudeste asiático (Daily, 2017).

Debido a la gravedad de esta enfermedad, la OMS ha catalogado la lucha contra la malaria como primordial. Para ello se han intensificado las medidas de prevención y control gracias a numerosas estrategias como las campañas de utilización de mosquiteras y fumigaciones con insecticidas de acción residual fundamentalmente, un diagnóstico temprano y la utilización de fármacos antipalúdicos también han contribuido a reducir el número de casos en algunas zonas geográficas. Existen programas internacionales que han ayudado a reducir la malaria como MIM (Iniciativa Multilateral sobre la Malaria) o RBM (Roll Back Malaria, con el objetivo de hacer retroceder a la malaria). Esto ha conseguido una reducción de las tasas de mortalidad de un 29% desde 2010 en todo el mundo (Girard et al., 2007). Sin embargo, y en contraposición a estos avances, han surgido resistencias tanto a los medicamentos tradicionales como a los insecticidas, así como la aparición de una malaria zoonótica (Antinori, Galimberti, Milazzo, & Corbellino, 2013). Por tanto, los esfuerzos por controlar y eliminar esta enfermedad siguen siendo una prioridad en muchas regiones del planeta.

Diversas investigaciones indican que esta enfermedad tiene su origen en los chimpancés, y se transfirió a los seres humanos (Escalante et al., 2005; Liu et al., 2010).

Existen más de 200 especies dentro del género *Plasmodium* que afectan a una gran cantidad de vertebrados como reptiles, roedores y aves. Sin embargo, solo 6 especies de *Plasmodium* infectan al hombre: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie*, *P. ovale wallikeri*, *P. ovale curtisi* y *P. knowlesi*. Esta última propia de simios en el sudeste asiático, sin embargo en las últimas décadas se han recogido numerosos casos de humanos infectados y es ya considerada como la quinta especie humana (Singh, Krishna, & Cox-Singh, 2014).

Plasmodium falciparum es la especie que produce la forma más grave de la enfermedad y el 90% de los casos se registran en África donde la población más afectada son los niños entre 0 y 5 años y las mujeres embarazadas. Además, es la que más infecciones produce en humanos (Harrison & Matson, 2003).

Plasmodium vivax está ampliamente distribuido: África, centro y sur de América, Asia, Oriente Medio y Pacífico occidental. Produce una forma menos grave de la enfermedad, sin embargo en los últimos años se está volviendo más virulenta y están apareciendo casos de malaria severa y muerte (Garrido-Cardenas, Cebrián-Carmona, González-Cerón, Manzano-Agugliaro, & Mesa-Valle, 2019).

Otras especies del protozoo parásito que afectan a humanos son (Mayxay, Pukrittayakamee, Newton, & White, 2004):

- *Plasmodium malariae*, es el agente causante de la “malaria benigna”, forma menos grave que la ocasionada por *P. falciparum* o *P. vivax*, aunque puede producir infecciones persistentes y asintomáticas durante largos periodos de tiempo. Su distribución es similar a *P. vivax* y en muchas ocasiones se dan infecciones mixtas o múltiples (Mueller, Zimmerman, & Reeder, 2007). Poco frecuente aunque seguramente el número de casos reales es muy superior a los diagnosticados (Källander, Nsungwa-Sabiiti, & Peterson, 2004).
- *Plasmodium ovale wallikeri* y *Plasmodium ovale curtisi*, se suelen observar principalmente en Asia y en el Oeste Africano.

1.1.2 Ciclo de vida de *Plasmodium*.

El ciclo de vida de *Plasmodium*, protozoo que pertenece al filum *Apicomplexa*, llamado así por poseer un órgano fundamental para la invasión de la célula hospedadora que es el complejo apical (Levine, 1988); posee un ciclo complejo en el que intervienen hospedadores vertebrados y hospedadores invertebrados que actúan como vectores. Los vectores siempre son hembras del género *Anopheles*, que actúan como hospedador definitivo donde ocurre la reproducción sexual (Ejigiri & Sinnis, 2009).

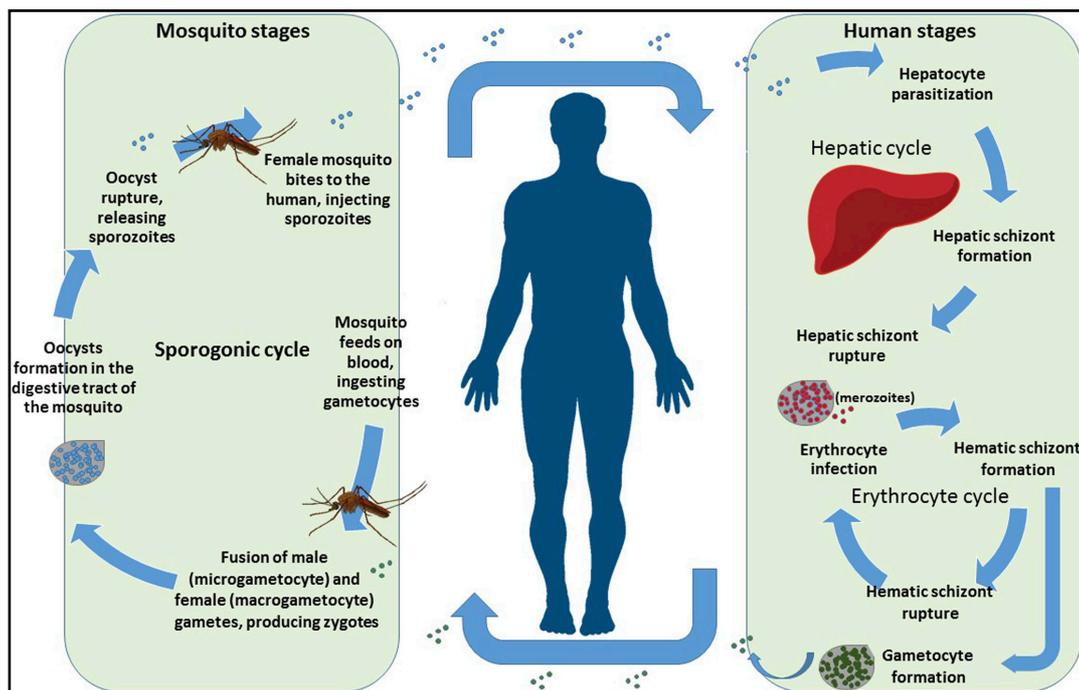


Figura 1 Ciclo de vida de *Plasmodium*. Recuperado de Plasmodium genomics: an approach for learning about and ending human malaria. *Parasitology research*, 118(1), 1-27.

En la Figura 1 se observan con detalle el ciclo de vida del protozoo parásito. Existen claramente dos fases o ciclos. La reproducción sexual en el mosquito es la fase esporogónica y la reproducción asexual en el hospedador intermediario correspondiente a la fase esquizogónica que puede ser hepática o exoeritrocítica y eritrocítica (Garrido-Cardenas, González-Cerón, Manzano-Agugliaro, & Mesa-Valle, 2018).

Las diferentes etapas del ciclo de vida de *Plasmodium*:

1. Comienza con la picadura de un mosquito *Anopheles* hembra infectado, ya que los mosquitos macho no tienen la capacidad de transmitir la infección. Estos mosquitos hembra inoculan los esporozoitos en el huésped vertebrado mientras se alimenta (Ménard et al., 2013).
2. Estos esporozoitos migran a las células del parénquima hepático por el torrente sanguíneo, proceso que dura aproximadamente entre una y tres horas (Acharya, Garg, Kumar, Munjal, & Raja, 2017).
3. El esporozoito invade un hepatocito, convirtiéndose en esquizontes, y posteriormente en miles de merozoitos. En *Plasmodium vivax* y *Plasmodium ovale* se forman además hipnozoitos, los cuales son unas formas inactivas, que suelen provocar recidivas o recaídas, debido a que los esporozoitos hepáticos pueden permanecer semanas o incluso meses en un estado latente o durmiente (Howes et al., 2016; Richards et al., 2013).
4. Los merozoitos que acaban de formarse invaden los eritrocitos, su localización exacta es en una vacuola parasitófora, pudiendo derivarse en dos vías:
 1. Una primera vía en la que pueden crecer y transformarse en esquizontes, los cuales son los productores de merozoitos, y estos de nuevo invaden a nuevos eritrocitos, dando lugar a una fase conocida como el ciclo de desarrollo intraeritrocítico, el cual es una pequeña parte del ciclo de vida de *Plasmodium*, pero en el que se expresan 2/3 partes de los genes de *Plasmodium*. Además, en esta fase, se observan una serie de numerosas diferencias en la expresión de varios genes de interés, entre *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*, que estudiaremos posteriormente. (Gilson & Crabb, 2009; Silvie, Mota, Matuschewski, & Prudêncio, 2008).
 2. En una segunda vía tras 2 o 3 esquizogonias eritrocíticas, algunos merozoitos, en lugar de convertirse en trofozoitos, se diferencian en microgametocitos y macrogametocitos, es decir, la formación de gametos machos y hembras. Por lo tanto, si un mosquito susceptible obtiene estos gametocitos mediante una picadura, lo que ocurre es que tiene lugar una nueva etapa. Esta se caracteriza por dar lugar a la diferenciación de los gametos en macho y hembra, y en la formación de cigotos, transformándose en oocinetos móviles. Los oocinetos se encargan de invadir el intestino de los mosquitos, y en la lámina basal se transforman en ooquistes, liberándose al hemocele, llegando así a las glándulas salivales. Una vez llegados a este punto, se inoculan al nuevo hospedador cuando el mosquito se alimenta de sangre, cerrando así el ciclo (Bansal, Molina-Cruz, Brzostowski, Mu, & Miller, 2017).

El parásito ha desarrollado diferentes mecanismos para evadir la respuesta inmune del hospedador. La diversidad antigénica de los diferentes estadios parasitarios, así como el polimorfismo de las proteínas del parásito son los principales (Roch et al., 2003).

1.2 PLASMODIUM VIVAX.

1.2.1 Conceptos generales.

Aproximadamente el 10% de las infecciones provocadas por este protozoo parásito se dan en el África subsahariana, aunque en esta región, predominan las infecciones ocasionadas por *Plasmodium falciparum*.

Sin embargo, si salimos de esta región, la mayoría de casos de malaria, son producidos por *Plasmodium vivax*, siendo responsable de más del 50% de los casos en todo el mundo, destacando su influencia en Medio Oriente, Sudamérica, algunas regiones de Asia y el Pacífico Occidental (Shobhona & Sulabha, 2008).

En los últimos años la comunidad científica ha mostrado un interés creciente por esta especie de *Plasmodium* (Conway, 2015). Uno de los motivos principales que han provocado numerosos estudios sobre *P. vivax* ha sido la aparición en ciertas regiones africanas de casos de malaria por *P. vivax* en personas con el antígeno Duffy negativo (Kaur, Sehgal, & Rani, 2019). Este antígeno se considera que era fundamental para la penetración del merozoito en el glóbulo rojo y por tanto la población negativa para Duffy se pensó que tenía protección frente a *P. vivax* ya que en el 95% de la población del oeste de África el antígeno Duffy está ausente y no se habían registrado casos hasta la fecha. (Kaur et al., 2019).

El problema reside en la duda que existe, por el si parásito ha evolucionado o los diagnósticos han sido erróneos y siempre han existido infecciones por *P. vivax* en África que quedaban enmascaradas por *P. falciparum*. (Zimmerman, Ferreira, Howes, & Mercereau-Puijalon, 2013). Existe una evidencia de la invasión de los eritrocitos ausentes de Duffy por *P. vivax*. Este hito nos indica que el protozoo parásito está evolucionando a una invasión alternativa a los eritrocitos (Menard et al., 2010).

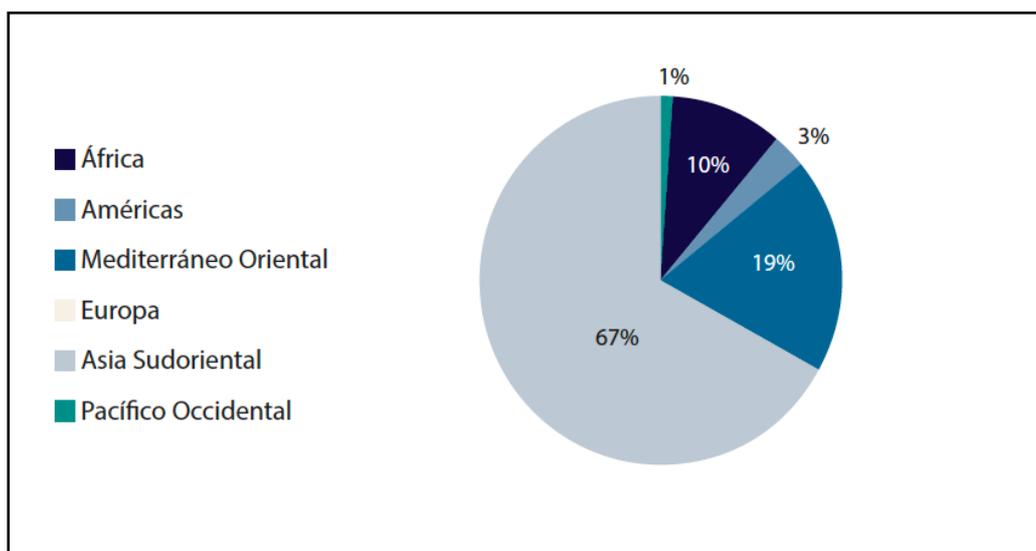


Figura 2 Representación gráfica del porcentaje del número mundial de infectados por *P. vivax* en cada región. (2019).

1.2.2 *Plasmodium vivax* en Sudamérica.

Plasmodium vivax es el responsable de la gran mayoría de casos de malaria ocasionados en Sudamérica. Por ello, las muestras analizadas en este estudio se obtienen de las regiones de las cordilleras del México del Sur. Los puntos rojos observados en la Figura 3, son algunas de las zonas de las que provienen las muestras que se han analizado.

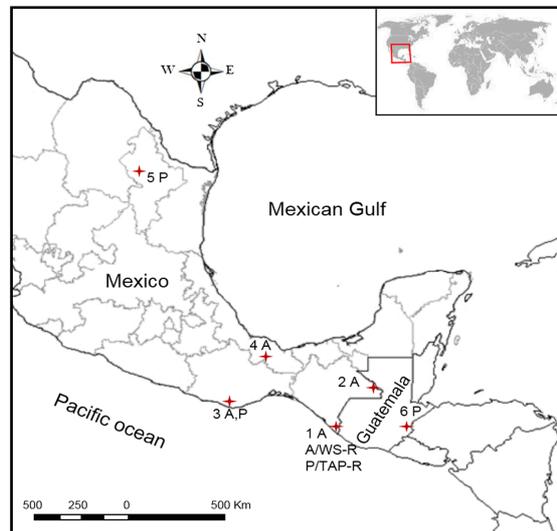


Figura 3 Localización geográfica del lugar del que proceden las muestras con malaria.

1.3 PRINCIPALES ESTRATEGIAS LLEVADAS A CABO PARA REDUCIR LA MALARIA.

En la lucha contra la malaria se están llevando a cabo una serie de estrategias en paralelo con la búsqueda de vacunas que reduzcan los casos de malaria, las que mayor efecto han tenido son las siguientes:

Mosquiteras tratadas (o no) con insecticidas.

La utilización de mosquiteras en las ventanas ha sido uno de los métodos más eficaces en la lucha contra esta enfermedad, logrando la mayor reducción de la malaria en los últimos años. En algunas ocasiones estas mosquiteras son tratadas con insecticidas de acción residual. El número de casos de malaria en zonas endémicas donde se ha generalizado el uso de mosquiteras ha descendido considerablemente («WHO. World Malaria Report 2014. Available online via http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/wmr-2014-no-profiles.pdf?ua=1», 2014).

Fumigación de interiores con insecticidas de acción residual.

La fumigación de interiores con insecticidas de acción residual (FIAR) junto con el uso de mosquiteras ha dado muy buenos resultados en la reducción de la transmisión de la malaria. Consiste en rociar el interior de las estructuras de las viviendas con insecticida, un o varias veces al año.

Medicamentos antipalúdicos.

Existen numerosos fármacos profilácticos, que son preventivos y que detienen la infección en su fase hemática, sin embargo, en la malaria es importante tanto la prevención como el tratamiento. En 2012, la OMS recomendó la quimioprofilaxis estacional de la malaria como estrategia de prevención de la enfermedad en zonas Africanas, mediante la administración de tandas terapéuticas de amodiaquina y sulfadoxina-primetamina (Luis & Capote, 2017). En la actualidad, los tratamientos más efectivos son las terapias combinadas con artemisina (ACT). Los tratamientos varían en función de la especie de *Plasmodium*, la zona geográfica y las características del paciente.

- *Tratamiento con primaquina.*

Las personas infectadas por *P. vivax*, pueden seguir un tratamiento con cloroquina para las fases sanguíneas y después con primaquina para la eliminación de los estadios hepáticos, y por lo tanto para actuar contra los hipnozoitos, formas predominantes latentes del parásito (Muñoz et al., 2006). Tiene un grave problema, la primaquina puede destruir los eritrocitos de los pacientes con una deficiencia enzimática genética (deficiencia de la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa [G6PD]) por lo que los médicos evitan administrar primaquina en las áreas geográficas donde habitualmente los pacientes presentan esta deficiencia.

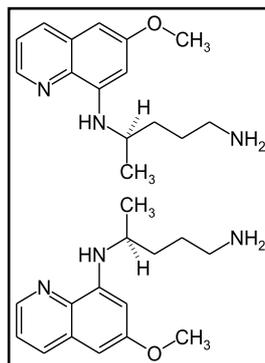


Figura 4 Estructura de la primaquina, fármaco eficaz contra *Plasmodium*.

1.4 PRINCIPALES INCONVENIENTES PARA REDUCIR LA MALARIA.

Plasmodium, así como la gran mayoría de protozoos parásitos como *Leishmania* o *Trypanosoma*, no tienen una vacuna o tratamiento efectivo contra la infección, a pesar de que todos estos parásitos infectan a millones de personas cada año. Esto se debe principalmente a su gran variabilidad antigénica en los diferentes estadios y al polimorfismo de sus proteínas. Los parásitos en general tienen una gran capacidad de adaptación a su hospedador y son capaces de desarrollar una gran variedad de estrategias que les permite sobrevivir evadiendo la respuesta inmune del hospedador (Ellis, Sagara, Doumbo, & Wu, 2010; Hoffman et al., 2010). Existen una serie de vacunas en desarrollo, y algunas de ellas parecen ser esperanzadoras. A pesar de ello, siguen siendo numerosas las dificultades para diseñar una vacuna, por ejemplo, la vacuna más desarrollada en la actualidad RTS,S/AS01B se encuentra ensayándose en África y los porcentajes de cobertura en la población no están siendo tan buenos como se esperaba.

Esta diferencia entre lo que se esperaba y lo que ha ocurrido en la realidad se debe a las variaciones en varios genes que codifican para enzimas y proteínas reguladoras lo cual sugiere que *Plasmodium*, tiene la capacidad de alterar su metabolismo, y por tanto, adaptarse a las condiciones de crecimiento de su huésped, y modificar su virulencia (Bozdech et al., 2008; Roch et al., 2003).

La dificultad para mantener un sistema de cultivo in vitro o la ausencia de animales de experimentación adecuados son inconvenientes en añadidos a la investigación en vacunas frente a la malaria (Gilson et al., 2019).

A todo lo anterior, en el caso de *P. vivax*, hay que sumar otras serie de causas que dificultan aún más la lucha contra la malaria:

- Su mayor capacidad vectorial en comparación con *P. falciparum* debido a su capacidad para desarrollarse a temperaturas más bajas y en un ciclo esporogónico más corto, lo que le permite la transmisión en zonas templadas (Olliaro et al., 2016).
- La existencia de formas latentes o hipnozoitos.
- Individuos con parasitemias bajas que son difíciles de detectar (Anstey, Douglas, Poespoprodjo, & Price, 2012; E. Lin et al., 2010).
- Su tropismo por los reticulocitos.

1.5 VACUNAS.

No existe una vacuna eficaz frente a la malaria. Esto se debe a su complejo ciclo de vida y su enorme variabilidad antigénica entre otras muchas razones. Por otro lado, los estudios y la información que se tiene de la respuesta inmune que *Plasmodium* ocasiona en el ser humano es escasa, si a esto le sumamos que los modelos para la experimentación son inadecuados o la imposibilidad de cultivo *in vitro* de las formas infecciosas, dificulta aún más el desarrollo de una vacuna. Otra razón es la existencia en algunos casos de infecciones cruzadas. Esto, hace referencia a personas infectadas, las cuales lo son por varias especies de *Plasmodium*, y no por una sola, lo que conlleva en gran medida a diagnósticos erróneos. Todo lo explicado anteriormente es consecuencia de la larga coevolución de *Plasmodium* con el hombre.

Los avances en biología molecular, genómica y proteómica de los parásitos están permitiendo avances importantes en la búsqueda de una vacuna eficaz frente a la malaria. Son muchas las vacunas que se encuentran en la actualidad en desarrollo y algunas de ellas en ensayos clínicos avanzados. En 2011 se introdujo el concepto de vacunas que interrumpen la transmisión de la malaria (VIMT) (Alonso et al., 2011); estas incluyen:

Vacunas de transmisión, son vacunas que desde los mosquitos reducen el número y la capacidad infectiva del parásito presente en el aparato digestivo y glándulas salivares del mosquito, conocidas como bloqueadoras de la transmisión. La vacuna TBV generaría anticuerpos neutralizantes frente a determinadas proteínas del parásito, cuya presencia en el torrente sanguíneo tendría como consecuencia que los parásitos que el mosquito vector obtiene tras picar al huésped infectado tendrían una viabilidad reducida (Carter, 2001). Estas vacunas son las conocidas como vacunas altruistas pues no confieren protección a la persona inmunizada, aunque es una medida de salud pública que beneficiaría a la población. Son una buena opción en programas nacionales de control de la enfermedad pero su eficacia dependerá de diversos factores (Lopez-Rodriguez, 2008).

Vacunas preeritrocíticas las cuales actúan sobre los esporozoítos, evitando la invasión de las células hepáticas (Coppi et al., 2011).

Vacunas eritrocíticas que actúan contra los merozoítos, bloqueando la invasión de eritrocitos y reduciendo las formas sanguíneas o hemáticas (Miura, 2016).

En la actualidad, todos los esfuerzos en la búsqueda de vacunas se centran en las vacunas preeritrocíticas y las eritrocíticas, aunque se están desarrollando frente a todas las fases.

1.5.1 Vacunas preeritrocíticas.

Las vacunas preeritrocíticas buscan una respuesta humoral/celular, mediante la inducción de anticuerpos que sean capaces de evitar que los esporozoítos invadan las células hepáticas, y la generación de linfocitos T capaces de eliminar los hepatocitos ya infectados. Este momento es esencial, debido a que el número de esporozoítos en esta fase es muy baja en comparación con los merozoítos liberados.

Una de las estrategias más esperanzadoras consiste en utilizar vectores virales recombinantes, los cuales interrumpen la síntesis de proteínas de los parásitos que dañan la inmunidad natural. La vacuna RTS,S/AS01B es de este tipo. Conocida comercialmente como Mosquirix. Es la que se encuentra en estado más avanzado de desarrollo y se dirige hacia la proteína del circumsporozoito (CS), que recubre los esporozoítos de *P. falciparum* y actúa como antígeno de la cepa NF54.7 (Sun et al., 2003). Tras 30 años de experimentación, en abril de 2019 se comenzó a aplicar a gran escala, inmunizando a más de 360.000 niños de las regiones de Malawi, Ghana y Kenia.

La vacuna RTS,S/AS01 está formada por la molécula RTS,S y por el adyuvante AS01. La RTS,S es un antígeno recombinante expresado en *Saccharomyces cerevisiae*. El antígeno está formado por dos proteínas, la RTS y la S. La proteína RTS es un polipéptido híbrido formado por una parte de la proteína CS y el tándem de repeticiones central, en la cual su extremo carboxiterminal está fusionado con la región amino-terminal del antígeno S del virus de la hepatitis B. La proteína S es el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B que GSK Biologicals usa en sus vacunas contra la hepatitis B. La proteína RTS se encuentra dentro de una partícula que también incluye una proteína S sin fusionar. Por otro lado, está el adyuvante AS01. La combinación de la RTS,S y del AS01 permite que la vacuna produzca una fuerte reacción inmunitaria (Alonso, 2006).

Su efectividad es mínima en comparación con otras vacunas no parasitarias utilizadas en la actualidad, por ejemplo, la triple vírica. Sin embargo, las vacuna preeritrocítica RTS,S (Mosquirix) es la más avanzada pero su eficacia no parece superar el 50% (Wilby, Lau, Gilchrist, & Ensom, 2012). Posee una baja efectividad, otra alternativa son las vacunas con esporozoítos atenuados cuya eficacia es mayor y existen algunas en fases muy avanzadas.

El interés de utilizar esporozoítos completos reside en que estos inducen una gran cantidad de anticuerpos contra múltiples antígenos, lo que da lugar a una fuerte respuesta humoral y celular. Los diferentes tipos de vacuna que existen son:

PfSPZ (*Plasmodium falciparum* sporozoite), atenuados por radiación.

PfSPZ-GA1, atenuados eliminando un gen que codifica para dos proteínas (van Schaijk et al., 2014).

PfSPZ-CVac, atenuados in vivo mediante la administración concomitante de un fármaco antipalúdico. Se trata de una terapia combinada (Mordmüller et al., 2017).

1.5.2 Vacunas eritrocíticas.

Las vacunas eritrocíticas, o en etapas de sangre, son la alternativa a las anteriores, pero tienen un desarrollo mucho más complejo, debido principalmente a que la mayoría de las proteínas de los merozoitos, no tienen poder antigénico y sobre todo, a la existencia de numerosos antígenos polimórficos (Miura, 2016).

El objetivo de estas vacunas reside en obtener proteínas diana de la superficie del merozoito, o bien del complejo apical, que se encuentran involucrados en la invasión del eritrocito (Richards et al., 2013). Las proteínas estudiadas son: MSP1, MSP2, MSP3, (Merozoite Surface Protein) son proteínas de la superficie del merozoito. Por otro lado RESA, (Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen) que es un antígeno de superficie de eritrocitos infectados con *Plasmodium*, cuyo aspecto al microscopio recuerda a un anillo, se trata de una forma morfológica del ciclo de vida del protozoo parásito (C. S. Lin et al., 2016).

En la actualidad, se están trabajando diferentes estrategias. Una de las ideas con una mayor proyección es el uso de proteínas antigénicas de varias fases del ciclo parasitario. NYVAC - PF7, se trata de una de las vacunas más novedosas. Contiene genes que codifican para proteínas en la fase preeritrocitaria (CSP, SSP (Sporozoite Surface Protein) y CSA1), en la fase eritrocitaria (MSP1, AMA1 (Apical Merozoite Antigen 1) y SERA) y en la fase del mosquito (PfS25) (Garrido-Cardenas et al., 2018).

1.5.3 Vacunas desarrolladas contra *Plasmodium vivax*.

La búsqueda de vacunas que puedan prevenir la infección ocasionada por *P. vivax* es compleja, pero ha aumentado de manera considerable en los últimos años. Esto ha dado lugar a la aparición de muchos proyectos de futuras vacunas contra el protozoo parásito *P. vivax*.

Vacuna CSP-PvS25.

Vacuna que se encuentra en fase de desarrollo, se trata de la PvS25H, una proteína recombinante derivada del antígeno de superficie (PvS25) de los oocinetos de *P. vivax* (Mordmüller et al., 2015). Su posible efectividad, se debe, a que el protozoo parásito no es capaz de expresar el antígeno PvS25 en humanos, por lo que no estará sujeto a cambios que puedan producirse por presión de la selección inmune en el huésped intermedio (Crompton, Pierce, & Miller, 2010; Vanderberg, 2009).

Esta peculiaridad, tiene una ventaja y una desventaja importantes. La gran ventaja es que apenas existe diversidad en las secuencias, esto facilita el desarrollo de la vacuna. Por otro lado, la desventaja es que si el paciente es infectado por *P. vivax*, no habrá un aumento en el refuerzo natural de la respuesta inmune a este antígeno PvS25 (Heppner, 2013; Thera & Plowe, 2012).

Vacuna DBP (antígeno duffy).

Es la única vacuna que se encuentra en fase de desarrollo clínico. En humanos la resistencia innata a la infección por *Plasmodium* está altamente relacionada con la presencia de polimorfismos en genes o en proteínas que se expresan en la superficie de los eritrocitos. Duffy es un antígeno de la superficie de los eritrocitos, en el que la condición homocigótica recesiva para el grupo sanguíneo Duffy, da lugar a la resistencia a la infección (Arévalo-Herrera & Herrera, 2001). Este antígeno es conservado funcionalmente y pertenece a la familia de proteínas de unión al eritrocito, EBP.

En el protozoo parásito existe una proteína que se une a Duffy, la proteína DBP (Duffy-Binding Protein, proteína de unión Duffy). El rol de esta proteína es la invasión de los eritrocitos por merozoitos de *P. vivax*. El merozoito se pega a la superficie de la célula. La DBP es localizada en los micronemas del protozoo parásito. Tras una reordenación del merozoito, se libera la DBP (Chen, Salinas, Ntumngia, Adams, & Tolia, 2015). Esta vacuna va dirigida a la interacción entre la proteína de unión al antígeno Duffy de *P. vivax* (DBP) y el antígeno eritrocitario humano Duffy.

El futuro a medio plazo es la combinación de varias vacunas, que sean capaces de actuar frente a las diferentes formas morfológicas del protozoo parásito.

1.6 CyRPA.

Como se explicó anteriormente, la invasión de *Plasmodium* requiere múltiples interacciones entre los ligandos de merozoitos y los receptores de los eritrocitos. El gen *CyRPA*, codifica para un antígeno protector rico en cisteína. Este tiene una función muy importante es capaz de unirse a una proteína de unión a eritrocitos (RH5) formando un complejo con una proteína de unión (RIPR). El complejo PfRH5 / PfRIPR / CyRPA es esencial en los eventos moleculares secuenciales que conducen a la invasión de eritrocitos humanos por los merozoitos de *Plasmodium* (Volz et al., 2016).

Dejando de lado la función imprescindible de esta proteína dentro del complejo, CyRPA también tiene gran importancia por su posible poder inmunogénico (Favuzza, Dreyer, Wittlin, Matile, & Pluschke, 2012), siendo una proteína en etapa eritrocitaria prometedora para su uso como vacuna frente a la malaria.

Es considerado un candidato prometedor en *P. vivax*, debido a que cumple dos condiciones fundamentales (Favuzza et al., 2017), que la secuencia de la proteína está muy conservada y los anticuerpos contra este antígeno, son capaces de inhibir el crecimiento del protozoo parásito in vivo.

La información acerca de esta proteína se tiene en la especie *Plasmodium falciparum*. En nuestro estudio queremos encontrarla en *Plasmodium vivax*. Una vez identificada, el objetivo es caracterizarla y aislarla. Las razones que nos llevaron al estudio de esta proteína fueron lo bien conservada que se encuentra entre especies y el interés que despierta su poder inmunogénico en *Plasmodium falciparum*.

2. OBJETIVOS.

Existe un interés creciente en la búsqueda de proteínas que tengan un elevado poder inmunogénico con el objetivo de poder ser utilizadas como vacunas en un futuro. En este trabajo, en concreto se trabaja con malaria. Se marcaron durante esta investigación una serie de objetivos:

- Obtención de ADN de *Plasmodium vivax* a partir de muestras de sangre seca procedentes de pacientes mexicanos infectados con malaria.
- Obtención del gen *CyRPA* a partir del ADN de *Plasmodium vivax*.
- Caracterización y análisis del gen *CyRPA*, tanto a nivel de secuencia de nucleótidos como de aminoácidos.
- Comparación del gen *CyRPA* de *Plasmodium vivax*, con el de otras especies del género *Plasmodium*.

Este trabajo de investigación es el comienzo de un proyecto a largo plazo. El objetivo final de este trabajo es la obtención de esta secuencia del gen *CyRPA*. Posteriormente, se clonará en un plásmido, para su utilización en la transformación de células de mosquito, mediante el sistema de expresión baculovirus: células de mosquito. Con el objetivo en última instancia, de la creación de una vacuna que sea capaz de ayudar a reducir los casos de malaria en el mundo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1 MATERIAL.

3.1.1 Material.

Las muestras de sangre seca llegaron al laboratorio el 12/12/18. Se trata de 10 muestras que proceden de diferentes pacientes mexicanos de diferentes regiones del sur de México.

3.1.2 Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR.

Se utilizaron una serie de oligonucleótidos cebadores de la PCR, algunos de ellos descritos previamente en bibliografía (Rubio et al., 1999), y otros diseñados en nuestro laboratorio. Los oligonucleótidos (Tablas 1 y 5) fueron sintetizados por la compañía IDT (*Integrated DNA Technologies*).

3.2 MÉTODOS.

3.2.1 Extracción de ADN.

3.2.1.1 Extracción de ADN de las muestras biológicas.

La extracción de ADN genómico se llevó a cabo mediante un método basado en el *Kit-GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit* (ThermoFisher Scientific) a partir de, aproximadamente, 1 cm² de la sección de filtro que contiene la muestra de sangre seca. Este material, tras introducirlo en un tubo de microcentrífuga y agregarle 200 µL del tampón 1xPBS, se deja incubar unos 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se le agregan 20 µL de la solución de proteinasa K y se procede a mezclar. A la mezcla anterior, se le adiciona 400 µL de solución de lisis, agitando hasta conseguir una suspensión uniforme.

Se incuban las muestras a 56 °C durante 10 minutos y se centrifuga a 3000 rpm 30 segundos. Se adiciona 200 µL de etanol (96-100%). En este momento, se traspasa la mezcla a la columna de centrifugación y se centrifuga a 6.000 x g durante 1 minuto a 20 °C. Se desecha el tubo de recolección y se repite la operación adicionando 500 µL de tampón de lavado WBI (con etanol agregado). Se centrifuga a 10.000 rpm durante 1 minuto, se vuelve a desechar el eluato, se adicionan 500 µL del tampón de lavado II y se centrifuga a máxima potencia (14.000 rpm) durante 1 minuto. Se transfiere la columna a un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL.

Para finalizar, se agregan entre 50 µL de tampón de elución al centro de la membrana de la columna para eluir el ADN genómico. Se incuba durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a 10.000 rpm durante 1 minuto. Para el almacenamiento de ADN se requiere de una temperatura de -20 °C.

3.2.1.2 Optimización de la extracción de ADN de las muestras biológicas.

El método de extracción de ADN explicado en el punto anterior requirió de una pequeña optimización. Se llevaron a cabo de forma paralela dos protocolos, con la finalidad de usar aquel que proporcione una mayor extracción del ADN de interés. El primer protocolo se caracterizó por tener una agitación

con vórtex durante un minuto. Por otro lado, en el segundo protocolo se realizaba esta agitación con el FastPrep24, con una velocidad de 4m/s durante 30 segundos. Las concentraciones obtenidas de ADN en ambas extracciones fueron similares, debido a ello se utilizó en adelante el método que implicaba un minuto de vórtex. El principal motivo fue la sencillez de este con respecto al otro protocolo.

3.2.2 Herramientas bioinformáticas.

3.2.2.1 Búsqueda de la secuencia del gen CyRPA en otros organismos.

Se utilizaron diferentes bases de datos para obtener la secuencia del gen de interés en organismos estrechamente relacionados con *Plasmodium vivax*. Cabe destacar el uso de la base de datos general del NCBI (National Center for Biotechnology Information) – perteneciente a la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos, una rama de los Institutos Nacionales de Salud – o PlasmoDB, una base de datos específica del género *Plasmodium*.

3.2.2.2 Diseño de cebadores.

Los cebadores se diseñaron utilizando herramientas de biología molecular. Una vez diseñados en el laboratorio, se comprobaron las diferentes características que estos tenían mediante la herramienta *Primer designing tool*, perteneciente al NCBI. Las características que este programa analiza y que son utilizadas para comprobar la especificidad de los oligonucleótidos con respecto a la secuencia que se desea amplificar son: la longitud de la cadena, tanto del cebador forward, como del reverse; la Tm o temperatura de meelting, que es la temperatura de funcionamiento óptima de los cebadores; el porcentaje de GC, cuyos valores para ambos cebadores deben ser similares; y, por último, el *self complementary* y el *self 3' complementary*, valores que nos indican la probabilidad de que se dé el fenómeno conocido como primers dimer, consistente en la unión de los cebadores entre sí.

3.2.2.3 Alineamientos.

Se realizaron numerosos alineamientos en los que se enfrentaron las secuencias obtenidas tras la secuenciación de ADN de las muestras biológicas, utilizando el programa Clustal Omega. Previamente, el programa Chromas Lite fue utilizado para analizar la calidad de las secuencias.

3.2.3 Cuantificación de la concentración de ADN.

Para la cuantificación del ADN obtenido a partir de las muestras de sangre se utilizó el Qubit Fluorometric Quantification. Este equipo nos permite medir las concentraciones de ADN, ARN y proteínas. Se utiliza un kit en el que se incluyen un Qubit reagent y un buffer o tampón. En primer lugar, hay que preparar una solución de trabajo mediante la adición de 199 μL del Qubit buffer y 1 μL del Qubit reagent. A 190 μL de esta solución se le añaden 8 μL de H_2O y 2 μL de la muestra cuya concentración se quiere medir. Tras esto se pasa por el vórtex 2-3 segundos y se mantiene a temperatura ambiente durante 2 minutos. Una vez medida la concentración de ADN, la disolución se puede desechar.

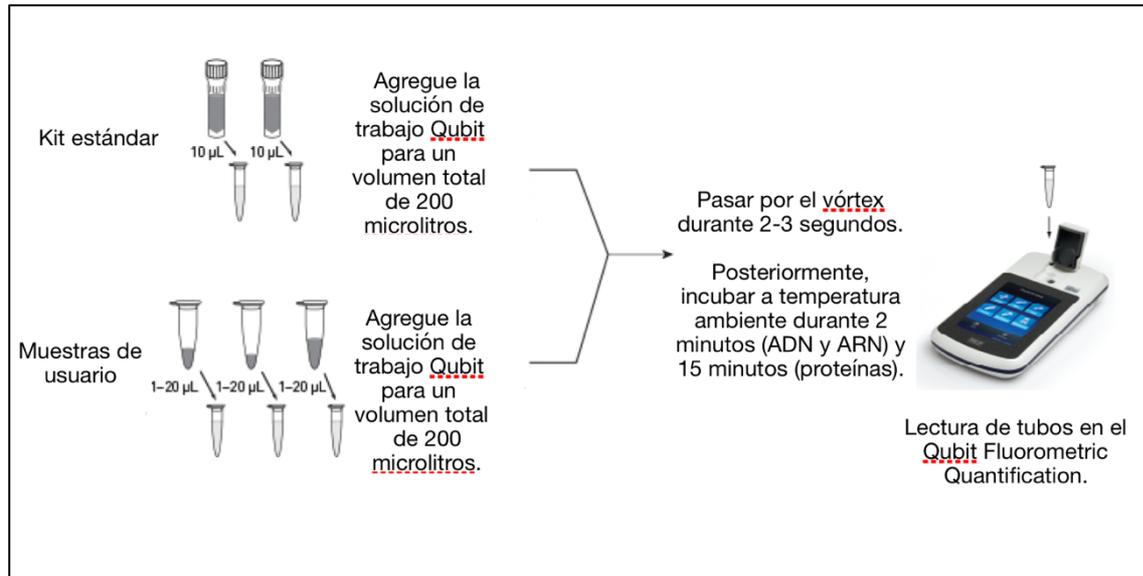


Figura 5 Método de cuantificación de ADN. Qubit Fluorometer.

3.2.4 Técnicas de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). PCR cuantitativa.

Esta técnica se basa en la amplificación de forma específica, mediante PCR, del fragmento del gen diana, utilizando un fluorocromo inespecífico que va a permitir detectar la síntesis de ADN de doble cadena uniéndose a él. El fluorocromo utilizado para esto fue el SYBRGreen. El equipo utilizado para la amplificación de ADN fue el termociclador MyGo Pro.

La reacción fue llevada a cabo en un volumen de 20 μL , con 2 μL del ADN molde, 2,5 μL de cada uno de los cebadores para una concentración final de 0,25 μM para cada uno de ellos, 3 μL de agua y 10 μL de un tampón de reacción que contenía la enzima ADN polimerasa, los nucleótidos utilizados para la amplificación del ADN y diferentes elementos que confieren a la reacción las condiciones iónicas adecuadas y de pH.

3.2.4.1 Optimización de la concentración de ADN en la qPCR.

Con el objetivo de optimizar el volumen de ADN utilizado, con anterioridad a llevar a cabo la reacción de PCR, diferentes volúmenes (1,2 y 4 μL) fueron utilizados. Todas las muestras dieron resultados positivos de amplificación con valores de Ct (Cycle Threshold) entre 24 y 29. Así que, en adelante, se utilizaría para estas reacciones 2 μL de ADN.

3.2.4.2 Re-amplificación.

La re-amplificación se trata de una reacción de PCR similar la explicada anteriormente, con la diferencia de que la muestra de ADN utilizada es el producto de una primera amplificación de PCR. Para realizar la reacción de PCR de re-amplificación se usaron los mismos reactivos y el mismo volumen final de reacción, con la única diferencia del uso de 1 μL del producto de la primera amplificación diluido 1:10.

3.2.4.3 Programas de PCR utilizados.

Se utilizaron cuatro programas diferentes de PCR. Todos ellos incluían tres etapas: una primera etapa de desnaturalización, una segunda etapa constituida por 40 ciclos, con tres etapas cada uno, de desnaturalización, anillamiento de los cebadores y extensión; y una última etapa de extensión final.

Los programas utilizados fueron los siguientes:

El primer programa se utilizó para la amplificación de un fragmento de ADN que permitió la identificación del género *Plasmodium* en las muestras biológicas iniciales. Para ello, se usaron unos cebadores descritos previamente, con una temperatura de anillamiento de 61 °C. Por lo tanto, el programa fue el siguiente.

Tabla 1: Primer programa de PCR utilizado.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)	No. Ciclo
Desnaturalización inicial	94	300	1
Desnaturalización	94	45	40
Hibridación	61	45	
Extensión	72	60	
Extensión final	72	600	1

El segundo programa utilizado se llevó a cabo para la reamplificación de las muestras amplificadas con el programa anterior. A diferencia de la anterior, la temperatura de anillamiento de los cebadores fue de 60 °C y los tiempos de reacción fueron más cortos.

Tabla 2: Segundo programa de PCR utilizado.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)	No. Ciclo
Desnaturalización inicial	94	300	1
Desnaturalización	94	30	40
Hibridación	60	30	
Extensión	72	30	
Extensión final	72	600	1

El siguiente programa utilizado tenía como objetivo la amplificación de la secuencia del gen *CyRPA*. Los cebadores utilizados fueron diseñados en nuestro laboratorio, por lo que tuvimos que optimizar las condiciones de reacción.

Tabla 3: Tercer programa de PCR utilizado.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)	No. Ciclo
Desnaturalización inicial	94	300	1

Desnaturalización	94	45	40
Hibridación	52	45	
Extensión	72	90	
Extensión final	72	600	1

Un cuarto programa de PCR fue utilizado, con una mayor temperatura de hibridación, para llevar a cabo reamplificaciones con mayor grado de especificidad utilizando los cebadores internos al gen *CyRPA*.

Tabla 4: Cuarto programa de PCR utilizado.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)	No. Ciclo
Desnaturalización inicial	94	300	1
Desnaturalización	94	45	40
Hibridación	57	45	
Extensión	72	60	
Extensión final	72	600	1

3.2.5 Purificación de los productos de PCR.

La purificación de los productos de PCR se realizó con un kit de Metabion, siguiendo el protocolo del proveedor, y eluyendo en todos los casos el ADN amplificado en un volumen final en 25 μL de H_2O . La decisión de almacenarlo en H_2O y no en Elution Buffer es debido a que en etapas posteriores se realizará la secuenciación de estos productos.

3.2.6 Secuenciación de los ácidos nucleicos.

La secuenciación se llevó a cabo utilizando el método de Sanger, de terminación de cadena o de dideoxinucleótidos. Se utilizó el kit comercial Byg Dye [®] Terminator v3.1 (Applied Biosystems). En las diferentes reacciones de secuenciación que se realizaron se emplearon entre 40-50 ng de los productos de PCR. El kit seguía un protocolo en el que se utilizaban 2 μL de Byg Dye Terminator, 3 μL de Sequencing Buffer, 1,6 μL de un cebador de concentración 2 μM , y agua hasta completar los 20 μL finales de la reacción.

3.2.7 Precipitación de los productos de la reacción de secuenciación.

Una vez que se realizó la reacción de secuenciación, se procedió a la precipitación del ADN mediante el método del Acetato/Etanol. Éste se basa en la adición de 1/10 volúmenes de EDTA 125 mM y ACO^- 3M a cada reacción de PCR y 2 volúmenes de Etanol. La mezcla se centrifuga a 14.000 rpm durante 20 minutos a 20 °C. Posteriormente se lava el precipitado con 80 μL de etanol 70% y se centrifuga a 14.000 rpm durante 5 minutos a 20 °C. Por último, se seca el precipitado con ayuda de un equipo concentrador de "speed vacuum", y se eluye en un volumen final de 8 μL de Hi-Di Formamida.

3.2.8. Reconstitución de los cebadores internos.

Los cebadores utilizados son recibidos como productos liofilizados que deben ser reconstituidos. Para ello, a cada cebador se le añade la cantidad necesaria de H₂O para llevarlo a una concentración final de 100 μM. Posteriormente, se preparan soluciones de trabajo de concentración 2 μM, diluyendo el stock inicial con H₂O.

3.2.9 Ensamblaje de las secuencias obtenidas.

Una vez que se obtuvieron los resultados positivos de la secuenciación, se procedió al ensamblaje de las secuencias. Partimos de 10-12 secuencias de entre 100-300 pb para cada muestra, por lo que teníamos un total unas 100-120 secuencias que fueron ensambladas de manera manual, con ayuda de un editor de texto. De las 10 muestras iniciales, se consiguió ensamblar con éxito 7 de ellas utilizando como criterio de calidad que cada nucleótido tuviera, al menos, 2 lecturas correctas diferentes. Una vez ensambladas las secuencias de nucleótidos para el gen *CyRPA*, con la utilización del programa Expasy, se obtuvo la secuencia de aminoácidos correspondiente para cada una de las 7 muestras.

3.2.10 Análisis cladístico de las secuencias.

El alineamiento de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las diferentes secuencias obtenidas se llevó a cabo usando el programa Clustal Omega (Multiple Sequence Alignment), con los diferentes parámetros de serie del software. Mediante el uso del programa MEGA v3.0 y mediante el uso de los algoritmos GTR y JTT, se realizaron los dos árboles filogenéticos correspondientes a las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos. Los árboles se plasmaron usando el programa TreeView.

Con el uso de programas estadísticos como Microsoft Excel, se realizaron diferentes análisis estadísticos sobre la similitud y la variación que existían entre las numerosas secuencias obtenidas de la secuenciación.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 IDENTIFICACIÓN DE *PLASMODIUM VIVAX* EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.

Se recibieron 10 muestras de sangre seca fijada en papel secante de pacientes procedentes del sur de México infectados con malaria, presumiblemente por *Plasmodium vivax*. Se realizaron extracciones de ADN de estas 10 muestras, obteniéndose concentraciones de ADN total entre 0,1 ng/μL y 0,37 ng/μL.

En esta primera extracción, con toda seguridad se obtuvo ADN humano, e incluso, es probable, que se extrajera ADN de diferentes especies de *Plasmodium*, incluyendo la de interés, *Plasmodium vivax*.

Posteriormente, se realizó una reacción de PCR. Esta reacción se llevó a cabo para amplificar el ADN codificante de una región del ARN ribosómico del género *Plasmodium* de las muestras extraídas. Para ello, se utilizó una pareja de cebadores (Tabla 5) descritos previamente en bibliografía (Rubio et al., 1999), un cebador forward específico, PLF, del género *Plasmodium* y un cebador reverse universal, UNR, es decir, que se une a la región 16S y permite la amplificación de la secuencia correspondiente de cualquier especie.

Tras esto, se llevó a cabo una segunda reacción de PCR, una reamplificación del producto anterior. Esta vez su finalidad era la de amplificar el ADN de la especie *Plasmodium vivax*, descartando así el resto de especies de este género. Para ello se utilizó una pareja de cebadores (Tabla 5) formada por el cebador PLF usado en la reacción previa, y un nuevo cebador reverse específico, VIR, de *Plasmodium vivax*, por lo que el resultado positivo en esta reamplificación nos indicó que había una alta probabilidad de que en nuestra muestra encontráramos la especie *Plasmodium vivax*.

Tabla 5: Cebadores utilizados en las reacciones de PCR.

Cebadores	Secuencias	Especificidad
Reverse (UNR)	GACGGTATCTGATCGTCTTC	Universal
Forward (PLF)	AGTGTGTATCCAATCGAGTTTC	<i>Plasmodium</i>
Reverse (VIR)	AGGACTTCCAAGCCGAAGC	<i>Plasmodium vivax</i>

Se obtuvieron productos de amplificación en las PCRs de todas las muestras. Los ciclos umbrales (Ct) obtenidos en todos los casos fueron muy bajos. Estos productos de amplificación fueron purificados mediante kits de columnas, y sus concentraciones fueron medidas mediante técnicas fluorométricas (Tabla 6):

Tabla 6: Concentración de los productos de amplificación obtenidos en la PCR y purificados.

Muestra	Concentración (ng/uL)	Muestra	Concentración (ng/uL)
1	32,6	6	42,4
2	39,6	7	37,1
3	33,9	8	37,6
4	39,3	9	35,4

5	38,8	10	36,9
---	------	----	------

Se obtuvieron los productos de amplificación de la PCR purificados. Para comprobar que la PCR había funcionado, y se habían amplificado las secuencias deseadas, secuencia del ribosómico de *Plasmodium vivax*, se llevó a cabo tres reacciones de secuenciación, una con cada cebador (Tabla 5), ya que estas reacciones requieren de un único cebador. Se precipitaron las muestras mediante un protocolo ya estandarizado y se secuenciaron.

Se obtuvieron unos resultados de la secuenciación que fueron enfrentados a la base de datos del NCBI para comprobar que las secuencias obtenidas pertenecían a la especie *Plasmodium vivax*, y no a cualquier otra especie del género *Plasmodium*.

4.2 OBTENCIÓN DEL GEN *CyRPA*.

En primer lugar, el gen *CyRPA* fue identificado en diferentes especies del género *Plasmodium*, como *P. falciparum* y *P. knowlesi*, a partir de las secuencias depositadas en la base de datos de secuencias de ADN, GenBank, del NIH (*National Institutes of Health*, de Estados Unidos). A partir de éstas, secuencias similares fueron identificadas en la especie *P. vivax* mediante la herramienta bioinformática de alineamiento de secuencias BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

A partir de las secuencias obtenidas se diseñaron tres cebadores. Un cebador forward y dos cebadores reverse, F1, R1 y R2 (Figura 6) (Tabla 9). En una primera reacción de PCR, utilizando los cebadores F1 y R2, (Figura 6) se obtuvo amplificación de todas las muestras con un Ct entre 24 y 28 ciclos. Las concentraciones de los productos de amplificación fueron medidas mediante métodos fluorométricos y se hallaban entre 3 y 23 ng/μL (Tabla 7).

Tabla 7: Concentración de los productos de amplificación del gen *CyRPA*.

Muestra	Concentración (ng/uL)	Muestra	Concentración (ng/uL)
1	6,04	6	3,22
2	17,6	7	5,38
3	22,6	8	18,7
4	19,4	9	20,6
5	18,6	10	20,9

Los productos de la primera amplificación del gen *CyRPA* fueron reamplificados utilizando el mismo cebador *forward* (F1) y un cebador *reverse* (R1) más interno que el anterior (R2). Se realizó la reacción de reamplificación con el objetivo de obtener una mayor concentración de la secuencia del gen *CyRPA* y, sobre todo, para evitar que se analice posteriormente alguna secuencia que no sea la deseada. Los productos de esta reamplificación fueron purificados mediante kits de columnas, y su concentración fue establecida mediante técnicas fluorométricas (Tabla 8).

Tabla 8: Concentración de los productos de reamplificación del gen *CyRPA*.

Muestra	Concentración (ng/uL)	Muestra	Concentración (ng/uL)
1	29,1	6	36,9
2	18,3	7	23,1

3	28,6	8	53
4	26,6	9	52
5	15,8	10	42,3

Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de secuenciación de los productos de la reamplificación. Se obtuvieron secuencias legibles por ambos extremos, pero no se consiguió una secuenciación completa del gen, por lo que se diseñaron nuevos cebadores internos. Se diseñaron 6 cebadores internos nuevos (Tabla 9). Esto se realizó para obtener un mayor número de lecturas de cada nucleótido del gen y para evitar perder alguna región de la secuencia.

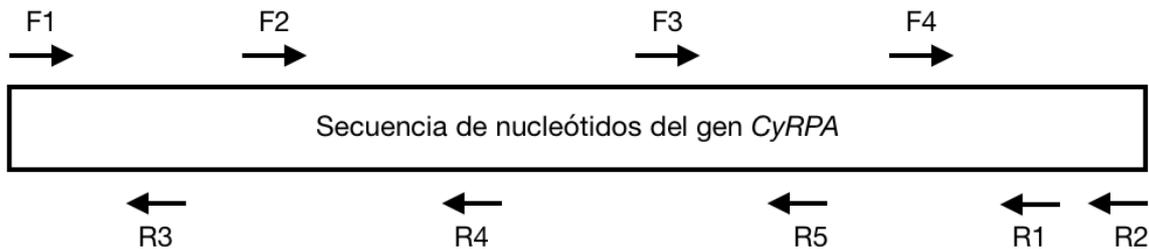


Figura 6 Disposición de los cebadores diseñados en la secuencia del gen *CyRPA*.

Tabla 9: Cebadores diseñados y utilizados para la amplificación del gen *CyRPA*. Se trata de 4 cebadores forward y 5 cebadores reverse.

Cebador	Secuencia
Reverse 1	AGTTGGGATGTGCTACTGGAG
Forward 1	TAAGTCTGCTTTCCTCTCTTGG-G
Reverse 2	AGACTGGAAAGACGCAACGG
Forward 2	TTGGAGGGACTTGTCCGGTT
Reverse 3	TGCTCTGTGTAGTAGAGG
Forward 3	TTTTTCTCCCCTTGGGAGGCTAC
Reverse 4	GTGGAAAGAAGTGTGTGGAGGT
Forward 4	TATGGGACTTTTGATGGTTG
Reverse 5	AACTGACTGGTATGAGTCC

4.3 ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE ADN.

De 3 de las 10 muestras estudiadas no se consiguió obtener unas secuencias de buena calidad, lo que pudo deberse a la presencia de múltiples productos de amplificación inespecíficos, o a la baja calidad del ADN de partida, entre otras. Las 7 muestras restantes se analizaron en profundidad. En primer lugar, se llevó a cabo el ensamblaje de las numerosas secuencias que se obtuvieron. Tras éste, se llevó a cabo el alineamiento de las secuencias ensambladas con las del gen *CyRPA* de otras especies de *Plasmodium*, como *P. knowlesi*, *P. falciparum*, y las secuencias de los hipotéticos genes *CyRPA* de las cepas de *P. vivax* que han sido secuenciadas mediante NGS (secuenciación masiva de ADN), como *PvC01*, *PvT01*, *PvP01* y *PvSal-1*. Los diferentes alineamientos de nucleótidos se encuentran en los anexos.

Posteriormente, a partir de las secuencias de nucleótidos se obtuvieron las correspondientes secuencias de aminoácidos, una vez eliminada de la secuencia el fragmento correspondiente a un intrón, y se volvieron a realizar alineamientos entre ellas (Figura 7). En este caso el alineamiento se realizó con las secuencias de aminoácidos de la proteína *CyRPA* de *P. falciparum*, *P. knowlesi* y de la cepa de *P. vivax* *PvSal-1*. El interés de realizar el alineamiento con esta cepa reside en que es la cepa secuenciada que procede de Sudamérica (El Salvador). Las otras 3 son de Asia.

El alineamiento entre las secuencias de aminoácidos tiene una mayor importancia que el de las secuencias de nucleótidos, ya que la degeneración del código genético puede hacer que diferencias en la secuencia de nucleótidos no se traduzcan en diferencias en la secuencia de aminoácidos.

Alineamiento secuencia de aminoácidos.

CYRPA.P.F	MIIPFHKKFIFFQIVLVVLLLCRSINCDSRHV-FIRTELSFKNNVPCIRDMFFIYKRE	59
CYRPA.P.K	MIVAKIAI-LFF---FLLSCTTYLTNEESKQV IILNDEITTI TSPVHCIA DTYFIFRNE	56
CYRPA.SAL-1	MIVTKIAIFLFF---FLFSFLRCLSTNTQSKNIIILNDEITTIKSPIHCITDIYFLFRNE	57
CYRPA7	MIVTKIAIFLFF---FLFSFLRCLSTNTQSKNIIILNDEITTIKSPIHCITDIYFLFRNE	57
CYRPA5	MIVTKIAIFLFF---FLFSFLRCLSTNTQSKNIIILNDEITTIKSPIHCITDIYFLFRNE	57
CYRPA9	MIVTKIAIFLFF---FLFSFLRCLSTNTQSKNIIILNDEITTIKSPIHCITDIYFLFRNE	57
CYRPA1	MIVTKIAIFLFF---FLFSFLRCLSTNTQSKNIIILNDEITTIKSPIHCITDIYFLFRNE	57
CYRPA8	MIVTKIAIFLFF---FLFSFLRCLSTNTQSKNIIILNDEITTIKSPIHCITDIYFLFRNE	57
CYRPA6	MIVTKIAIFLFF---FLFSFLRCLSTNTQSKNIIILNDEITTIKSPIHCITDIYFLFRNE	57
CYRPA10	MIVTKIAIFLFF---FLFSFLRCLSTNTQSKNIIILNDEITTIKSPIHCITDIYFLFRNE	57
	** : * . * : * * : : . : * : * . : * * * : * : : *	
CYRPA.P.F	LYNICLDDLKGEEDETHIYVQKKVKDSWITLNDLFKETDLTGRPHIFAYVDVEEIIILLC	119
CYRPA.P.K	LYKICIQHVNKGRTEIHVIVQKKAKNKWETKQKLFEDKMMWFLPFFVNFVQND EIIILVC	116
CYRPA.SAL-1	LYKTCIQHVIKGRTEIHVLVQKKINSTWETQTTLFKDHMMWFELPSVFNFIHNDEIIIVIC	117
CYRPA7	LYKTCIQHVIKGRTEIHVLVQKKINSTWETQTTLFKDHMMWFELPSVFNFIHNDEIIIVIC	117
CYRPA5	LYKTCIQHVIKGRTEIHVLVQKKINSTWETQTTLFKDHMMWFELPSVFNFIHNDEIIIVIC	117
CYRPA9	LYKTCIQHVIKGRTEIHVLVQKKINSTWETQTTLFKDHMMWFELPSVFNFIHNDEIIIVIC	117
CYRPA1	LYKTCIQHVIKARTEIHVLVQKKINSTWETQTKLFEDNMMWFELPSVFNFIHNDEIIIVIC	117
CYRPA8	LYKTCIQHVIKARTEIHVLVQKKINSTWETQTKLFEDNMMWFELPSVFNFIHNDEIIIVIC	117
CYRPA6	LYKTCIQHVIKARTEIHVLVQKKINSTWETQTKLFEDNMMWFELPSVFNFIHNDEIIIVIC	117
CYRPA10	LYKTCIQHVIKARTEIHVLVQKKINSTWETQTKLFEDNMMWFELPSVFNFIHNDEIIIVIC	117
	** : * : : : * * : * * * : . : * * * : * : * : : . : * * * : * : : *	
CYRPA.P.F	EDEEFSNRKKDMTCHRFYSNDGKEYNNSEITISDYILKDKLLSSYVSLPLKIENREYFLI	179
CYRPA.P.K	RYKGMTK-GEGVACDRWSS TGTNYNKGNI NIDAQALTKMNLDSYASFPPIPKDKAI IHI	175
CYRPA.SAL-1	RYKQRSK-REGTICKRWNSVTGTIYQKEDVQIDKEAFANKNLESYQSVPLTVKKNKFLLI	176
CYRPA7	RYKQKSK-REGTSCERWNSVTGTIYKKEGVQIGKEAFANKNLD SYQSVPLTVKDKKFLLI	176
CYRPA5	RYKQKSK-REGTSCERWNSVTGTIYKKEGVQIGKEAFANKNLD SYQSVPLTVKDKKFLLI	176
CYRPA9	RYKQKSK-REGTSCERWNSVTGTIYKKEGVQIGKEAFANKNLESYQSVPLTVKKNKFLLI	176
CYRPA1	RYKQKSK-RKETICERWNSVTGTIYKKEENVQIGKEAFDNKNLD SYQSVPLTVKDKKFLLI	176
CYRPA8	RYKQKSK-RKETICERWNSVTGTIYKKEENVQIGKEAFDNKNLD SYQSVPLTVKDKKFLLI	176
CYRPA6	RYKQKSK-RKETICERWNSVTGTIYKKEENVQIGKEAFDNKNLD SYQSVPLTVKDKKFLLI	176
CYRPA10	RYKQKSK-RKETICERWNSVTGTIYKKEENVQIGKEAFDNKNLD SYQSVPLTVKDKKFLLI	176
	. : : : * : * * . * : : * . : . * . * * * : : : : * *	
CYRPA.P.F	CGVSPYKFKDDNKDDILCMASHDKGETWGT-KIVIKYDNYKLGVQYFFLRPYISKNDLS	238
CYRPA.P.K	CGVHSYEQNVNQNNFISCLASEDKGTTWGDIKIHIYDQFQEGVPYFYLRPLVFNDFEG	235
CYRPA.SAL-1	CGILSYEYKTANKDNFISCVASEDKGRTWGT-KILINYEELQKGVPFYLRPIIFGDEFG	235
CYRPA7	CGILSYEYETANKDNFISCVASEDKGRTWGT-KILINYEELQKGI PFYLRPIIFGDEFG	235
CYRPA5	CGILSYEYETANKDNFISCVASEDKGRTWGT-KILINYEELQKGI PFYLRPIIFGDEFG	235
CYRPA9	CGILSYEYETANKDNFISCVASEDKGRTWGT-KILINYEELQKGI PFYLRPIIFGDEFG	235
CYRPA1	CGILSYEYKTANKDNFISCVASEDKGRTWGT-KILINYEELQKGI PFYLRPIIFGDEFG	235
CYRPA8	CGILSYEYKTANKDNFISCVASEDKGRTWGT-KILINYEELQKGI PFYLRPIIFGDEFG	235
CYRPA6	CGILSYEYKTANKDNFISCVASEDKGRTWGT-KILINYEELQKGI PFYLRPIIFGDEFG	235
CYRPA10	CGILSYEYKTANKDNFISCVASEDKGRTWGT-KILINYEELQKGVPFYLRPIIFGDEFG	235
	** : * : : * : : * * : * * * * * * * * * : : * : * * : * * : : : .	
CYRPA.P.F	FHFYVGDNINNV-KNVNFI ECT-----HEKDLEFVCSNRDFLKD NKVLQDVSTLNDEYI	291
CYRPA.P.K	FYLYSRIS SNNADRGKYM KCILNPTN SRNKEYTFKCTNVNLIKEDKSLQNI TKLNGYYV	295
CYRPA.SAL-1	FYFYSRISTNNTARGGNMTCTLDVTNEGKKEYKFKCKHVSLIKPKDKSLQNVTKLNGYYI	295
CYRPA7	FYFYSRISTNNTARGGNMTCTLEEPNES-KKYKFKCKHVSLIKPKDKSLQNVTKLNGYYI	294
CYRPA5	FYFYSRISTNNTARGGNMTCTLEEPNES-KKYKFKCKHVSLIKPKDKSLQNVTKLNGYYI	294
CYRPA9	FYFYSRISTNNTARGGNMTCTLEEPNES-KKYKFKCKHVSLIKPKDKSLQNVTKLNGYYI	294
CYRPA1	FYFYSRISTNNTARGGNMTCTLEEPNEGKKEYKFKCKHVSLIKPKDKSLQNVTKLNGYYI	295
CYRPA8	FYFYSRISTNNTARGGNMTCTLEEPNEGKKEYKFKCKHVSLIKPKDKSLQNVTKLNGYYI	295
CYRPA6	FYFYSRISTNNTARGGNMTCTLEEPNEGKKEYKFKCKHVSLIKPKDKSLQNVTKLNGYYI	295



Figura 7 Alineamiento de las diferentes secuencias de aminoácidos obtenidas para la proteína CyRPA. Los aminoácidos marcados en rojo son los que son diferentes respecto a la secuencia de la cepa PvSal-1. Los asteriscos (*) hacen referencia a que los residuos son 100% idénticos entre las diferentes secuencias. Los dos puntos (:) hacen referencia a aminoácidos de características similares. El punto (.), a aminoácidos con menor grado de similitud. La ausencia de símbolo hace referencia a la inexistencia de consenso o similitud entre secuencias.

4.4 ANÁLISIS DEL ALINEAMIENTO.

4.4.1 Análisis de variación entre secuencias.

A partir de la Figura 7, se ha realizado un análisis estadístico de la variación que existe entre estas secuencias de aminoácidos.

Tabla 10: Análisis de la variación que existe entre las secuencias estudiadas y la secuencia de aminoácidos presente en la cepa PvSal-1, de *P. vivax*.

Secuencia	Nº de cambios	% Variación
CyRPA 1	18	4,86
CyRPA 5	17	4,59
CyRPA 6	18	4,86
CyRPA 7	17	4,59
CyRPA 8	18	4,86
CyRPA 9	15	4,05

Secuencia	Nº de cambios	% Variación
CyRPA10	19	5,14
CyRPA <i>Pk</i>	108	29,19
CyRPA <i>Pf</i>	240	64,86

Todas las secuencias de las muestras que se han analizado tienen un pequeño porcentaje de variación con respecto a la secuencia *PvSal-1*. Esto puede deberse a la capacidad de este protozoo parásito para dar lugar a secuencias alternativas de una proteína, haciendo muy difícil encontrar una secuencia 100% conservada entre diferentes cepas.

4.4.2 Análisis de similitud.

Se ha realizado un análisis similar, con las secuencias obtenidas de las muestras de México comparándolas tanto en su secuencia de nucleótidos como de aminoácidos con todas las secuencias del gen *CyRPA* descritas (Tabla 11).

Tabla 11: Análisis de la similitud entre las diferentes secuencias obtenidas y las secuencias del gen *CyRPA* en diferentes especies de *Plasmodium* y diferentes cepas de la especie *Plasmodium vivax*.

Muestras	Nº de nucleótidos	Nº de aminoácidos	<i>P. falciparum</i>		<i>P. knowlesi</i>	
			% Sim (pb)	% Sim (Aa)	% Sim (pb)	% Sim (Aa)
M1	1101	366	48,14	35,68	76,39	67,57
M5	1098	365	47,50	35,41	76,29	67,03
M6	1101	366	47,87	35,41	76,39	67,57
M7	1098	365	47,50	35,41	76,39	67,03
M8	1101	366	47,96	35,41	76,39	67,57
M9	1098	365	47,50	35,41	76,11	66,49
M10	1098	366	47,96	36,22	76,39	67,57

Muestras	Nº de nucleótidos	Nº de aminoácidos	<i>PvSal-1</i>		<i>PvP01</i>	
			% Sim (pb)	% Sim (Aa)	% Sim (pb)	% Sim (Aa)
M1	1101	366	98,46	95,14	98,18	96,72
M5	1098	365	97,73	95,41	97,00	94,81
M6	1101	366	98,46	95,14	98,18	96,72
M7	1098	365	97,82	95,41	97,09	94,81

M8	1101	366	98,46	95,14	98,18	96,72
M9	1098	365	97,73	95,95	97,09	94,81
M10	1098	365	97,64	94,86	97,64	96,17

			PvC01		PvT01	
Muestras	Nº de nucleótidos	Nº de aminoácidos	% Sim (pb)	% Sim (Aa)	% Sim (pb)	% Sim (Aa)
M1	1101	366	97,55	89,62	98,00	96,45
M5	1098	365	96,82	89,34	96,55	93,44
M6	1101	366	97,55	89,62	98,00	96,45
M7	1098	365	96,91	89,34	96,64	93,44
M8	1101	366	97,55	89,62	98,00	96,45
M9	1098	365	96,91	89,34	96,46	93,44
M10	1098	365	96,73	89,07	97,18	95,36

En la tabla 11 se observa que las muestras analizadas presentan una mayor similitud de secuencias con las cuatro cepas de *P. vivax*, tal y como se presuponía. Siendo (% Sim) el porcentaje de similitud; (pb) el análisis a las pares de bases o nucleótidos y (Aa) el análisis a los aminoácidos.

Entre las siete muestras estudiadas, existe una mayor similitud entre las número 5, 7, 9 y 10, con la cepa *PvSal-1*, tanto en la secuencia de aminoácidos como en la de nucleótidos. Por otro lado, las muestras 1, 6 y 8 tienen una mayor similitud con la cepa *PvPO1*, incluyendo el tamaño de proteína ya que éstas presentan 366 aminoácidos frente a los 365 aminoácidos de las cuatro muestras anteriores.

4.4.3 Análisis filogenético.

A partir de los alineamientos de las secuencias tanto de nucleótidos como de aminoácidos para la proteína CyRPA, se obtuvieron los correspondientes árboles filogenéticos (Figuras 8 y 9).

Árbol filogenético a partir de la secuencia de nucleótidos.

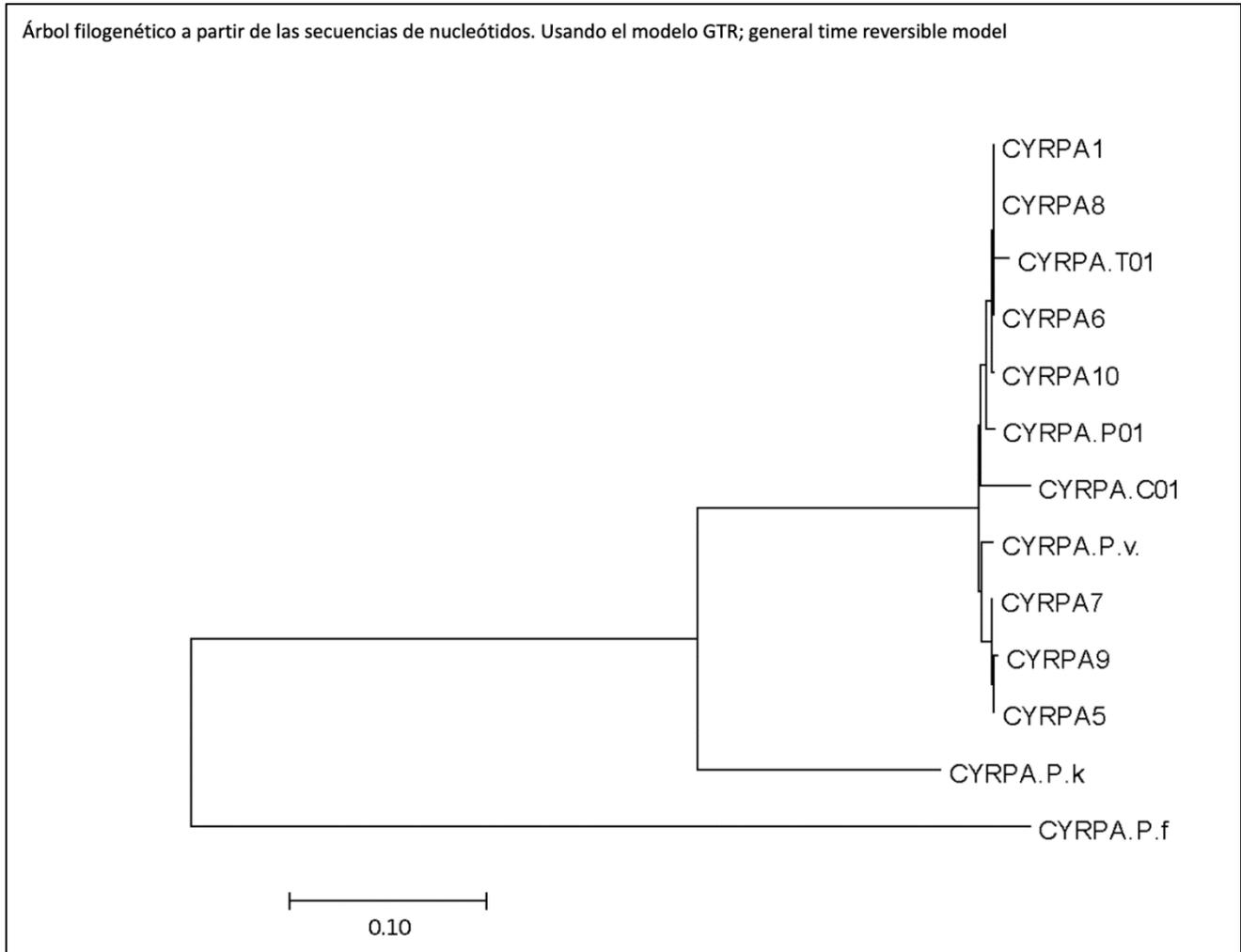


Figura 8 Árbol filogenético obtenido a partir del alineamiento de las secuencias de nucleótidos del gen *CyRPA*. El modelo utilizado para su obtención fue el GTR (general time reversible model). El gen *CyRPA* de *Plasmodium falciparum* fue utilizado como outgroup. La secuencia que aparece en el árbol como *CyRPA.P.v* es la secuencia del gen *CyRPA* de la cepa *PvSal-1*, de *P. vivax*.

En la figura 8, se observa que las secuencias de las muestras 5, 7 y 9 se agrupan entre ellas formando un clado, y a su vez con la secuencia del gen *CyRPA* de la cepa *PvSal-1*. Por otro lado, las secuencias de las muestras 1, 8 y 6, forman un clado agrupándose entre ellas, pues aparecen en el mismo nodo y con la secuencia del gen *CyRPA* de la cepa *PvT01*. La secuencia de la muestra 10, se encuentra en un nodo intermedio entre la secuencia de la cepa *PvP01* y la *PvT01*.

Árbol filogenético a partir de la secuencia de aminoácidos.

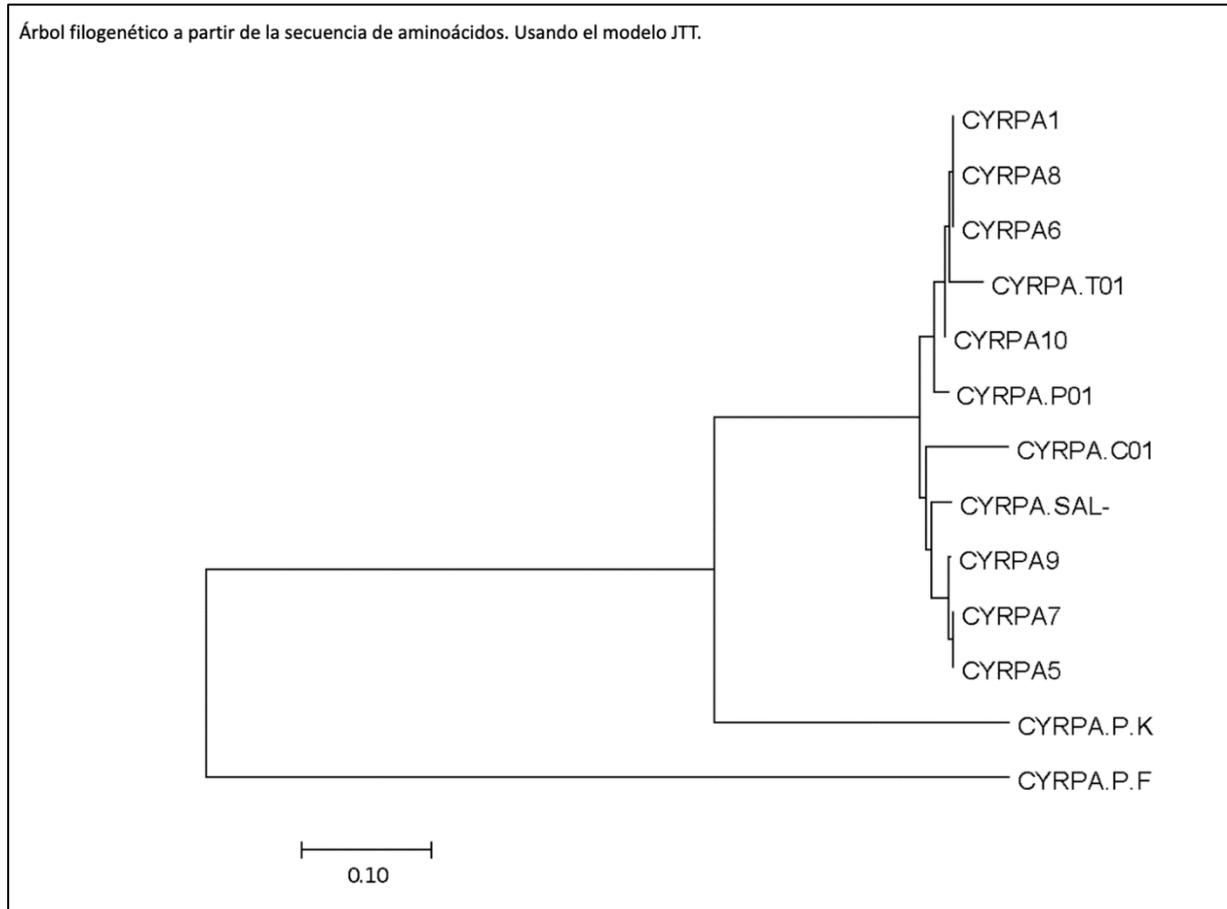


Figura 9 Árbol filogenético obtenido a partir del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína CyRPA. El modelo utilizado para su obtención fue el de sustitución de aminoácidos JTT. El gen *CyRPA* de *Plasmodium falciparum* fue utilizado como outgroup.

En la figura 9, se observan ligeras diferencias con respecto al árbol filogenético obtenido a partir de la secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, se agrupan en un nodo más específico las secuencias de las muestras 5 y 7, y posteriormente en otro nodo con la secuencia de la muestra 9, mientras que en el árbol anterior (Figura 8), este agrupamiento más específico se da entre las secuencias 5 y 9, y posteriormente con la 7. Las secuencias de aminoácidos de estas muestras presentan una menor divergencia filogenética con la secuencia de la cepa *CyRPA PvSal-1*, al igual que lo que ocurría en el árbol anterior.

Por otro lado, se engloba en el mismo nodo a las secuencias de las muestras 1, 8 y 6, mientras que, en la representación obtenida a partir del alineamiento de las secuencias de nucleótidos, la muestra 6 se encontraba en un nodo diferente. Estas tres tienen una menor divergencia en su secuencia de aminoácidos con la secuencia de la cepa *PvT01*, como ocurría anteriormente.

4.5 CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA GENÓMICA DEL GEN *CyRPA* EN *P. VIVAX*.

Una vez completado el análisis de las secuencias obtenidas, se llevó a cabo la caracterización del gen de interés. Para ello, se determina una secuencia de ADN consenso que sea lo más representativa posible de todas las demás. El gen *CyRPA* del organismo *Plasmodium vivax* tiene una longitud de 1327 pares de bases y posee dos exones, de 617 y 484 pares de bases cada uno, y un intrón de 226 pares de bases (Figura 10). Por lo tanto, la secuencia codificante del gen *CyRPA* posee 1101 pb.

```

ATGATAGTCACCAAAATTGCAATTTTCCTCTTCTTCTTCTTCTCCTTCCTAAGGTGCCTAAGCACCAA
CACACAGAGCAAAAACATAATCATCCTGAACGACGAAATAACAACCATCAAAAGTCCCATACACTGCAT
CACGGACATTTATTTCTTCCGAAATGAACTATACAAAACCTGCATACAGCACGTCATCAAGGGGAG
AACAGAAATCCATGTCCTCGTGCAGAAGAAAATCAACAGCACTTGGGAAACACAAACGACGCTCTTTA
AAGATCATATGTGGTTCGAACTCCCATCCGTTTTTAATTTCAATCATAACGACGAAATTATTATTGTAATT
TGCAGATATAAACAAAGGTCAAAAAGGGAAGGAACCATCTGTAAGCGGTGGAACAGCGTCACGGGGA
CCATTACCAAAGGAGGACGTTCAAATAGATAAAGAAGCTTTTGCCAACAAAATTTGGAGTCATACC
AGTCAGTCCCCTAACAGTTAAAAACAAAAAATTTTTACTCATTGCGGAATACTTTCTACGAATATAA
AACTGCGAACAAGGATAATTTCAATTTCTTGCCTGGCCAGTGAAGACAAGGGAAGAACATGGGGgtaagt
agcctccaaggggagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagacccttttacgctccccataagggaga
gacgcgtttgtctgccataacaccaataaattgggtcactcccacaacctaaccctaaccctaaccctaaccctccacac
acttctttcacacctcctccccactcgccgctcccccccgtagAACCAAATCCTGATAAACTACGAAGAGCTCCAGA
AAGGAGTCCCCTACTTCTACCTGCGGCCATCATTTTTGGCGACGAATTCGGGTTCTACTTACTCCCG
AATAAGCACCAACAACACGGCCCCGGGGGGCAACTACATGACGTGCACCTTGACGTGACGAACGAA
GGTAAGAAAGAATATAAATTCAAATGCAAACACGTCACTCATTAAACCGGACAAGTCCCTCCAAAAC
GTCATAAGCTAAACGGATACTACATAACCAGCTACGTCAAAAAGGACAATTTCAATGAGTGCTACCTC
TACTACACAGAGCAAAACGCCATCGTGGTGAACCAAAGGTGCAAAATGATGACCTTAACGGGTGCTA
CGGAGGCTCCTTTGTAAACTGGATGAGTCCAAGGCGCTTTCATCTATTCCACTGGCTACGGCGTTCA
GAACATACACACGCTTTACTATACGAGGTACGACTGA

```

Figura 10 Secuencia de nucleótidos del gen *CyRPA*. Los nucleótidos que aparecen en minúscula corresponden al intrón, mientras que los que aparecen en mayúscula corresponden a los dos exones.

El análisis de la composición de nucleótidos del gen *CyRPA* revela un contenido de AT de un 57,12% y un contenido de GC de un 42,88%, mientras que el de la región codificante presenta un contenido de AT de 57,49% y un contenido de GC de 42,51%.

Se llevó a cabo un análisis estadístico mediante el software genomatrix de la región codificante del gen, en el que se estudió el número de veces que aparecían tanto nucleótidos simples, como dinucleótidos y trinucleótidos.

Tabla 12: Estudio de la presencia de cada nucleótido en la secuencia del gen *CyRPA*.

	in bp	in %
A	381	34.60%
C	264	23.98%
G	204	18.53%
T	252	22.89%

Según los datos observados en la Tabla 12, se aprecia una mayor presencia de Adenina, que del resto de nucleótidos, con un 34,60%. La base que aparece con menor presencia es la Guanina, con un 18,53%, mientras que Timina y Citosina aparecen con porcentajes similares, de un 22,89% y un 23,98% respectivamente.

Tabla 13: Estudio de las combinaciones de dos nucleótidos en la secuencia del gen *CyRPA*.

		second nucleotide			
		A	C	G	T
first nucl.	A	153	98	57	72
	C	96	56	47	65
	G	68	41	55	40
	T	63	69	45	75

Tabla 14: Estudio de las combinaciones de tres nucleótidos en la secuencia del gen *CyRPA*.

		second/third nucleotide															
		AA	AC	AG	AT	CA	CC	CG	CT	GA	GC	GG	GT	TA	TC	TG	TT
first nucl.	A	62	38	28	25	33	16	29	20	17	12	16	12	25	14	11	22
	C	34	19	16	27	22	11	5	18	17	4	13	13	22	15	9	19
	G	32	15	11	9	15	6	9	11	20	9	16	10	5	15	13	7
	T	25	26	2	10	26	23	4	16	14	16	10	5	11	25	12	27

Las tablas 13 y 14, permiten el análisis de todas las combinaciones posibles entre diferentes nucleótidos. Se observa de manera cuantitativa el número de veces que aparece cada uno. En la tabla 13, se cuantifica la combinación entre dos nucleótidos, siendo AA la que más aparece y GT la que tiene una menor presencia. En la tabla 14 se observa que el triplete que más se repite en la secuencia del gen *CyRPA* es AAA, mientras el que menos es TAG.

4.6 CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA PROTEICA DE CyRPA EN *P. VIVAX*.

La secuencia obtenida a partir de la secuencia consenso de nucleótidos revela que CyRPA está compuesta por 366 aminoácidos (Figura 11).

```
MIVTKIAIFLFFFLSFLRCLSTNTQSKNIIILNDEITTIKSPIHCITDIYFLFRNELYKTCIQHVIKGRTEIHVLVQKK
INSTWETQTTLFKDHMWFELPSVFNFIHNDEIIVICRYKQRSKREGTICKRWNSVTGTIYQKEDVQIDKEAFA
NKNLESYQSVPLTVKNKKFLLICGILSYEYKTANKDNFISCVASEDKGRTWGTKILINYEELQKGVVPYFYLRIIF
GDEFGFYFYSRISTNNTARGGNYMTCTLDVTNEGKKEYKFKCKHVSLIKPKSLQNVTKLNGYYITSYVKKDN
FNECYLTYTEQNAIVVVKPKVQNDLNGCYGGSFVKLDESKALFIYSTGYGVQNIHTLYTRYD
```

Figura 11 Secuencia de aminoácidos de la proteína CyRPA.

La composición de aminoácidos revela una cantidad elevada de Lisina y presenta los aminoácidos Histidina, Triptófano y Metionina en una proporción muy baja. Además, la Alanina y la Arginina también aparecen en muy baja concentración.

Aminoácido	Nº residuos	%	Aminoácido	Nº residuos	%
<i>Ala</i>	8	2,2	<i>Leu</i>	26	7,2
<i>Arg</i>	11	3,0	<i>Lys</i>	37	10,2
<i>Asn</i>	27	7,5	<i>Met</i>	3	0,8
<i>Asp</i>	16	4,4	<i>Phe</i>	22	6,1
<i>Cys</i>	11	3,0	<i>Pro</i>	9	2,5
<i>Gln</i>	13	3,6	<i>Ser</i>	20	5,5
<i>Glu</i>	23	6,4	<i>Thr</i>	28	7,7
<i>Gly</i>	16	4,4	<i>Trp</i>	4	1,1
<i>His</i>	6	1,7	<i>Tyr</i>	26	7,2
<i>Ile</i>	36	9,9	<i>Val</i>	20	5,5

Tabla 15: Composición de la secuencia de aminoácidos de la proteína del gen *CyRPA*.

El peso molecular de esta proteína es de 42538,91 Da. Su punto isoeléctrico se encuentra en 8,8 y posee una ligera carga positiva a pH neutro, debido a que posee un número de residuos con carga positiva (Lisina y Arginina) de 48, mientras que los residuos con carga negativa (Aspartato y Ácido glutámico) son 39.

6. CONCLUSIONES.

Las principales conclusiones a las que se ha llegado tras la realización de este trabajo han sido las siguientes.

- 1- Se ha conseguido obtener el ADN de *Plasmodium vivax* de todas las muestras de los pacientes infectados.
- 2- Se han diseñado unos cebadores que han permitido llevar a cabo la secuenciación de las muestras.
- 3- Se ha conseguido obtener la secuencia del gen *CyRPA* de 7 de las 10 muestras. La obtención de la secuencia de nucleótidos de *CyRPA* ha permitido demostrar que el gen que codifica en *Plasmodium vivax* posee un intrón y dos exones. Además, se ha comprobado que su secuencia de aminoácidos da lugar a una proteína. En especies del mismo género, la proteína homóloga tiene potencial inmunogénico, por lo que es posible que esta también lo posea.
- 4- La representación filogenética, así como la realización de numerosos estudios de variación y similitud, nos ha permitido confirmar que existen unas diferencias del gen *CyRPA* en diferentes muestras.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- Acharya, P., Garg, M., Kumar, P., Munjal, A., & Raja, K. D. (2017). Host-parasite interactions in human malaria: Clinical implications of basic research. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAY), 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00889>
- Alonso, P. L. (2006). Malaria : deploying a candi- date vaccine (RTS , S / AS02A) for an old scourge of. *Health (San Francisco)*, 83-93.
- Alonso, P. L., Brown, G., Arevalo-Herrera, M., Binka, F., Chitnis, C., Collins, F., ... Tanner, M. (2011). A research Agenda to underpin Malaria Eradication. *PLoS Medicine*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000406>
- Anstey, N. M., Douglas, N. M., Poespoprodjo, J. R., & Price, R. N. (2012). *Plasmodium vivax: Clinical Spectrum, Risk Factors and Pathogenesis. Advances in Parasitology* (Vol. 80). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397900-1.00003-7>
- Antinori, S., Galimberti, L., Milazzo, L., & Corbellino, M. (2013). Plasmodium knowlesi: The emerging zoonotic malaria parasite. *Acta Tropica*, 125(2), 191-201. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.10.008>
- Arévalo-Herrera, M., & Herrera, S. (2001). Plasmodium vivax malaria vaccine development. *Molecular Immunology*, 38(6), 443-455. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00080-3](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00080-3)
- Bansal, A., Molina-Cruz, A., Brzostowski, J., Mu, J., & Miller, L. H. (2017). Plasmodium falciparum Calcium-Dependent Protein Kinase 2 Is Critical for Male Gametocyte Exflagellation but Not Essential for Asexual Proliferation . *mBio*, 8(5), 1-17. <https://doi.org/10.1128/mbio.01656-17>
- Bozdech, Z., Mok, S., Hu, G., Imwong, M., Jaidee, A., Russell, B., ... Preiser, P. R. (2008). The transcriptome of Plasmodium vivax reveals divergence and diversity of transcriptional regulation in malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(42), 16290-16295. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807404105>
- Carter, R. (2001). Transmission blocking malaria vaccines. *Vaccine*, 19(17), 2309-2314. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00521-1](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00521-1)
- Chen, E., Salinas, N. D., Ntumngia, F. B., Adams, J. H., & Tolia, N. H. (2015). Structural Analysis of the Synthetic Duffy Binding Protein (DBP) Antigen DEKnull Relevant for Plasmodium vivax Malaria Vaccine Design. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(3), 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003644>
- Conway, D. J. (2015). Paths to a malaria vaccine illuminated by parasite genomics. *Trends in Genetics*, 31(2), 97-107. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.12.005>
- Coppi, A., Natarajan, R., Pradel, G., Bennett, B. L., James, E. R., Roggero, M. A., ... Sinnis, P. (2011). The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(2), 341-356. <https://doi.org/10.1084/jem.20101488>
- Crompton, P. D., Pierce, S. K., & Miller, L. H. (2010). Science in medicine Advances and challenges in malaria vaccine development. *Health (San Francisco)*, 120(12), 4168-4178. <https://doi.org/10.1172/JCI44423.4168>
- Daily, J. P. (2017). Malaria 2017: Update on the Clinical Literature and Management. *Current Infectious Disease Reports*, 19(8), 1-7. <https://doi.org/10.1007/s11908-017-0583-8>
- Ejigiri, I., & Sinnis, P. (2009). Plasmodium sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. *Current Opinion in Microbiology*, 12(4), 401-407. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.06.006>
- Ellis, R. D., Sagara, I., Doumbo, O., & Wu, Y. (2010). Blood stage vaccines for Plasmodium falciparum: Current status and the way forward. *Human Vaccines*, 6(8), 627-634. <https://doi.org/10.4161/hv.6.8.11446>

-
- Escalante, A. A., Cornejo, O. E., Freeland, D. E., Poe, A. C., Durrego, E., Collins, W. E., & Lal, A. A. (2005). A monkey's tale: The origin of *Plasmodium vivax* as a human malaria parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(6), 1980-1985. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409652102>
- Favuzza, P., Dreyer, A. M., Wittlin, S., Matile, H., & Pluschke, G. (2012). Cysteine-Rich Protective Antigen (CyRPA) as promising blood-stage candidate protein for inclusion in a malaria subunit vaccine. *Malaria Journal*, *11*(S1), 1-2. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-s1-p30>
- Favuzza, P., Guffart, E., Tamborrini, M., Scherer, B., Dreyer, A. M., Rufer, A. C., ... Rudolph, M. G. (2017). Structure of the malaria vaccine candidate antigen CyRPA and its complex with a parasite invasion inhibitory antibody. *eLife*, *6*(3), 1-21. <https://doi.org/10.7554/elife.20383>
- Garrido-Cardenas, J. A., Cebrián-Carmona, J., González-Cerón, L., Manzano-Agugliaro, F., & Mesa-Valle, C. (2019). Analysis of Global Research on Malaria and *Plasmodium vivax*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *16*(11), 1928. <https://doi.org/10.3390/ijerph16111928>
- Garrido-Cardenas, J. A., González-Cerón, L., Manzano-Agugliaro, F., & Mesa-Valle, C. (2018). *Plasmodium* genomics: an approach for learning about and ending human malaria. *Parasitology Research*. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6127-9>
- Gilson, P. R., & Crabb, B. S. (2009). Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. *International Journal for Parasitology*, *39*(1), 91-96. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.09.007>
- Gilson, P. R., Nguyen, W., Poole, W. A., Teixeira, J. E., Thompson, J. K., Guo, K., ... Sleeb, B. E. (2019). Evaluation of 4-amino 2-anilinoquinazolines against *Plasmodium* and other apicomplexan parasites in vitro and in a *P. falciparum* Humanized NOD-scid IL2R null Mouse Model of Malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (December), 1-44. <https://doi.org/10.1128/AAC.01804-18>
- Girard, M. P., Reed, Z. H., Friede, M., & Kieny, M. P. (2007). A review of human vaccine research and development: Malaria. *Vaccine*, *25*(9), 1567-1580. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.09.074>
- Harrison, J., & Matson, P. (2003). Patterns and controls of nitrous oxide emissions from waters draining a subtropical agricultural valley. *Global Biogeochemical Cycles*, *17*(3), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1029/2002GB001991>
- Heppner, D. G. (2013). The malaria vaccine-Status quo 2013. *Travel Medicine and Infectious Disease*, *11*(1), 2-7. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2013.01.006>
- Hoffman, S. L., Billingsley, P. F., James, E., Richman, A., Loyevsky, M., Li, T., ... Sim, B. K. L. (2010). Development of a metabolically active, non-replicating sporozoite vaccine to prevent *Plasmodium falciparum* malaria. *Human Vaccines*, *6*(1). <https://doi.org/10.4161/hv.6.1.10396>
- Howes, R. E., Battle, K. E., Mendis, K. N., Smith, D. L., Cibulskis, R. E., Baird, J. K., & Hay, S. I. (2016). Global epidemiology of *Plasmodium vivax*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *95*(Suppl 6), 15-34. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0141>
- Källander, K., Nsungwa-Sabiiti, J., & Peterson, S. (2004). Symptom overlap for malaria and pneumonia - Policy implications for home management strategies. *Acta Tropica*, *90*(2), 211-214. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.11.013>
- Kaur, H., Sehgal, R., & Rani, S. (2019). Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) and susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria. *Parasitology International*, *71*(December 2018), 73-75. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.03.013>
- Levine, N. D. (1988). *The Protozoan Phylum Apicomplexa Volume I. Volume II*.
- Lin, C. S., Uboldi, A. D., Epp, C., Bujard, H., Tsuboi, T., Czabotar, P. E., & Cowman, X. A. F. (2016). Multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 complexes mediate merozoite binding to human erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(14), 7703-7715. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.698282>
-

-
- Lin, E., Kiniboro, B., Gray, L., Dobbie, S., Robinson, L., Laumaea, A., ... Mueller, I. (2010). Differential patterns of infection and disease with *P. falciparum* and *P. vivax* in young Papua New Guinean children. *PLoS ONE*, *5*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009047>
- Liu, W., Li, Y., Learn, G. H., Rudicell, R. S., Robertson, J. D., Keele, B. F., ... Hahn, B. H. (2010). Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature*, *467*(7314), 420-425. <https://doi.org/10.1038/nature09442>
- Lopez-Rodriguez, M. H. (2008). Avances en el desarrollo de vacunas contra la malaria. *Revista Biomedica*, *19*(1), 61-79. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2008/bio081h.pdf>
- Luis, R., & Capote, M. (2017). Tratamiento supresivo del paludismo en áreas endémicas Malaria suppression treatment in endemic areas, *55*(3), 62-79.
- Mayxay, M., Pukrittayakamee, S., Newton, P. N., & White, N. J. (2004). Mixed-species malaria infections in humans. *Trends in Parasitology*, *20*(5), 233-240. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.03.006>
- Menard, D., Barnadas, C., Bouchier, C., Henry-Halldin, C., Gray, L. R., Ratsimbaoa, A., ... Zimmerman, P. A. (2010). *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(13), 5967-5971. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912496107>
- Ménard, R., Tavares, J., Cockburn, I., Markus, M., Zavala, F., & Amino, R. (2013). Looking under the skin: The first steps in malarial infection and immunity. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(10), 701-712. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3111>
- Miura, K. (2016). Progress and prospects for blood-stage malaria vaccines. *Expert Review of Vaccines*, *15*(6), 765-781. <https://doi.org/10.1586/14760584.2016.1141680>
- Mordmüller, B., Supan, C., Sim, K. L., Gómez-Pérez, G. P., Ospina Salazar, C. L., Held, J., ... Kremsner, P. G. (2015). Direct venous inoculation of *Plasmodium falciparum* sporozoites for controlled human malaria infection: A dose-finding trial in two centres. *Malaria Journal*, *14*(1), 0-10. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0628-0>
- Mordmüller, B., Surat, G., Lagler, H., Chakravarty, S., Ishizuka, A. S., Lalremruata, A., ... Kremsner, P. G. (2017). Sterile protection against human malaria by chemoattenuated PfSPZ vaccine. *Nature*, *542*(7642), 445-449. <https://doi.org/10.1038/nature21060>
- Mueller, I., Zimmerman, P. A., & Reeder, J. C. (2007). *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* - the «bashful» malaria parasites. *Trends in Parasitology*, *23*(6), 278-283. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.04.009>
- Muñoz, J., Velasco, M., Alonso, D., Valls, M. E., Corachán, M., & Gascón, J. (2006). ¿Cuánta primaquina es necesaria para erradicar los hipnozoitos de *Plasmodium vivax*? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *24*(1), 29-30. <https://doi.org/10.1157/13083372>
- Olliaro, P. L., Barnwell, J. W., Barry, A., Mendis, K., Mueller, I., Reeder, J. C., ... Wongsrichanalai, C. (2016). Implications of *Plasmodium vivax* biology for control, elimination, and research. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *95*(Suppl 6), 4-14. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0160>
- Richards, J. S., Arumugam, T. U., Reiling, L., Healer, J., Hodder, A. N., Fowkes, F. J. I., ... Beeson, J. G. (2013). Identification and prioritization of merozoite antigens as targets of protective human immunity to *Plasmodium falciparum* malaria for vaccine and biomarker development. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *191*(2), 795-809. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300778>
- Roch, K. G. Le, Zhou, Y., Blair, P. L., Grainger, M., Moch, J. K., Haynes, J. D., ... Winzeler, E. A. (2003). Discovery of Gene Function by Expression. *Science*, *301*(5639), 1503-1508. <https://doi.org/10.1126/science.1087025>
-

-
- Rubio, J. M., Benito, A., Roche, J., Berzosa, P. J., García, M. L., Mico, M., Edu, M. (1999). Semi-Nested, Multiplex Polymerase Chain Reaction for Detection of Human Malaria Parasites and Evidence of Plasmodium Vivax Infection in Equatorial Guinea. *Am J Trop Med Hyg*, 60(2), 183–187.
- Shobhona, S., & Sulabha, P. (2008). Malaria vaccine: a current perspective. *Journal of Vector Borne Diseases*, 45(1), 1-20.
- Silvie, O., Mota, M. M., Matuschewski, K., & Prudêncio, M. (2008). Interactions of the malaria parasite and its mammalian host. *Current Opinion in Microbiology*, 11(4), 352-359. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.005>
- Singh, B., Krishna, S., & Cox-Singh, J. (2014). Plasmodium knowlesi: the Fifth Human Malarial Parasite. *Emerging Infections* 9, 46, 261-271. <https://doi.org/10.1128/9781555816803.ch13>
- Sun, P., Schwenk, R., White, K., Stoute, J. A., Cohen, J., Ballou, W. R., ... Krzych, U. (2003). Protective immunity induced with malaria vaccine, RTS,S, is linked to Plasmodium falciparum circumsporozoite protein-specific CD4+ and CD8+ T cells producing IFN-gamma. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(12), 6961-6967. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.12.6961>
- Thera, M. A., & Plowe, C. V. (2012). Vaccines for Malaria: How Close Are We? *Annual Review of Medicine*, 63(1), 345-357. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-022411-192402>
- van Schaijk, B. C. L., Ploemen, I. H. J., Annoura, T., Vos, M. W., Foquet, L., van Gemert, G.-J., ... Sauerwein, R. W. (2014). A genetically attenuated malaria vaccine candidate based on P. falciparum b9/slarp gene-deficient sporozoites. *eLife*, 3. <https://doi.org/10.7554/elife.03582>
- Vanderberg, J. P. (2009). Reflections on early malaria vaccine studies, the first successful human malaria vaccination, and beyond. *Vaccine*, 27(1), 2-9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.10.028>
- Volz, J. C., Yap, A., Sisquella, X., Thompson, J. K., Lim, N. T. Y., Whitehead, L. W., ... Cowman, A. F. (2016). Essential Role of the PfRh5/PfRipr/CyRPA Complex during Plasmodium falciparum Invasion of Erythrocytes. *Cell Host and Microbe*, 20(1), 60-71. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.06.004>
- WHO. World Malaria Report 2014. Available online via http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/wmr-2014-no-profiles.pdf?ua=1. (2014).
- Wilby, K. J., Lau, T. T. Y., Gilchrist, S. E., & Ensom, M. H. H. (2012). Mosquirix (RTS,S): A novel vaccine for the prevention of Plasmodium falciparum malaria. *Annals of Pharmacotherapy*, 46(3), 384-393. <https://doi.org/10.1345/aph.1Q634>
- Zimmerman, P. A., Ferreira, M. U., Howes, R. E., & Mercereau-Puijalon, O. (2013). *Red Blood Cell Polymorphism and Susceptibility to Plasmodium vivax*. *Advances in Parasitology* (Vol. 81). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407826-0.00002-3>
-