



Explorando los mecanismos de invasión celular de *Plasmodium Vivax* a través del sistema de grupo sanguíneo Duffy

Exploring the mechanisms of *Plasmodium Vivax* cell invasion through the Duffy blood group system

Laura Valentina Méndez Ospina^{ID}, Laura Viviana Peña Peña^{ID}, Verónica Ángel Peña^{ID}

RESUMEN

Introducción: La malaria por *P. vivax* representa un grave problema de salud pública a nivel mundial, especialmente en regiones tropicales. Se creía que la ausencia del antígeno Duffy protegía contra esta infección. Sin embargo, estudios han demostrado que *P. vivax* puede infectar a individuos Duffy negativos, sugiriendo mecanismos de invasión alternativos. **Objetivo:** Este artículo tiene como objetivo comprender los mecanismos de invasión que *P. vivax* utiliza para infectar eritrocitos en individuos Duffy positivos, así como explorar las posibles vías de infección en individuos Duffy negativos. **Metodología:** Búsqueda bibliográfica en las bases de datos PubMed, LILACS y Google Scholar, publicaciones entre los años 2009 al 2024, en idiomas español e inglés, empleando los siguientes términos: DARC, malaria, *P. vivax*, PvEBP, PvDBP y sistema de grupo sanguíneo Duffy. **Resultados:** La invasión por *P. vivax* se ha vinculado principalmente a la interacción entre la proteína PvDBP y DARC. Sin embargo, el creciente reporte de infecciones en individuos Duffy-negativos ha llevado al estudio de posibles rutas alternativas. Entre las hipótesis planteadas se incluyen la duplicación del gen *PvDBP*, la interacción entre *TjR1* y *PvRBP2b*, y el *PvEBP* como ligando alternativo, debido a sus similitudes estructurales con *PvDBP*. **Conclusión:** La comprensión de los mecanismos de invasión de *P. vivax* en eritrocitos es importante para el desarrollo a futuro de terapias innovadoras y estrategias de control. La identificación de rutas alternativas, especialmente en individuos Duffy-negativos, destaca la necesidad de explorar nuevos blancos terapéuticos para interrumpir el ciclo sanguíneo del parásito y avanzar en su eliminación. **Palabras clave:** DARC. Malaria. *Plasmodium vivax*. PvDBP. PvEBP. Sistema de grupo sanguíneo Duffy.

* Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Recepción: 07/11/2024. Aceptación: 14/03/2025

Cómo citar este artículo: Méndez Ospina LV., Peña Peña LV., Ángel Peña V. Explorando los mecanismos de invasión celular de *Plasmodium Vivax* a través del sistema de grupo sanguíneo Duffy. Hechos Microbiol. 2024;15(2): DOI: 10.17533/udea.hm.v15n2a03

ABSTRACT

Introduction: malaria caused by *Plasmodium vivax* represents a serious public health problem worldwide, especially in tropical regions. The absence of the Duffy antigen was thought to protect against this infection; however, studies have shown that *P. vivax* can infect Duffy-negative individuals, suggesting alternative invasion mechanisms. **Objective:** This article aims to understand the invasion mechanisms that *P. vivax* uses to infect erythrocytes in Duffy-positive individuals, as well as to explore possible infection routes in negative individuals. **Methodology:** Literature search in the PubMed, LILACS and Google Scholar databases, publications between 2009 and 2024, in Spanish and English, using the following terms: DARC, malaria, *P. vivax*, PvEBP, PvDBP and Duffy blood group system. **Results:** *P. vivax* invasion has been mainly linked to the interaction between the PvDBP protein and DARC. However, the increasing reports of infections in Duffy-negative individuals have led to the study of possible alternative pathways. Hypotheses include *PvDBP* gene duplication, interaction between Tfr1 and PvRBP2b, and PvEBP as an alternative ligand, due to its structural similarities with PvDBP. **Conclusion:** Understanding the mechanisms of *P. vivax* invasion in erythrocytes is important to develop innovative therapies and control strategies. The identification of alternative pathways, especially in Duffy-negative individuals, highlights the need to explore new therapeutic targets to interrupt the blood cycle of the parasite and advance its elimination.

Keywords: DARC. Malaria. *Plasmodium vivax*. PvDBP. PvEBP. Duffy blood group system.

Introducción

La malaria, también conocida como paludismo, es una enfermedad infecciosa aguda causada por parásitos protozoarios del género *Plasmodium* [1]. Actualmente, varias especies producen patología en humanos, entre ellas *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi* [2]. De estas, *P. vivax* y *P. falciparum* representan un desafío significativo para la salud pública a nivel mundial, ya que son responsables de más del 95% de todas las infecciones de malaria en el mundo,

siendo *P. vivax* la especie más extendida geográficamente y la principal causa de enfermedad en el sudeste asiático, América del Sur y el noreste de África [3,4]. La capacidad de *P. vivax* para adaptarse a diversos climas, su habilidad para permanecer en forma de hipnozoitos latentes en el hígado, su alto potencial de transmisión debido a la producción temprana y abundante de gametocitos, y la dificultad para realizar cultivos continuos *in vitro* debido a su tropismo exclusivo por reticulocitos, resaltan los desafíos en la búsqueda de tratamientos efectivos y en el estudio biológico del parásito [3,5,7,8].

Según el último informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2022 se notificaron aproximadamente 249 millones de casos de malaria en todo el mundo, y se estima que esta enfermedad causó el fallecimiento de alrededor de 608,000 personas [9]. Según los datos del Instituto Nacional de Salud (INS) de Colombia, en la última semana epidemiológica de 2023 (semana 52), se reportó un acumulado de 102.457 casos, de los cuales 100.744 fueron de malaria no complicada y 1.713 de malaria complicada. La infección predominante fue *P. vivax*, representando un 63,0 % (64 565), seguida de *P. falciparum* con 35,9 % (36.814), e infección mixta con 1,1 % (1.078) [10].

Plasmodium vivax presenta un ciclo de vida complejo que comienza cuando un mosquito del género *Anopheles* (**Fig. 1**), infectado con el parásito, pica a un hospedador humano e inocula esporozoitos [1]. Los esporozoitos atraviesan la dermis, ingresan en los capilares y se dirigen al hígado para invadir los hepatocitos [4]. En esta etapa, algunos se convierten en trofozoitos y luego maduran en esquizontes, mientras que otros se transforman en hipnozoitos inactivos, los cuales pueden reactivarse semanas o meses después de la infección primaria, dando lugar a episodios recurrentes de malaria [4]. Los esquizontes maduros liberan merozoitos que migran al torrente sanguíneo para invadir a los reticulocitos [4]. En esta fase, los merozoitos se transforman en trofozoitos inmaduros (anillos), trofozoitos maduros y esquizontes [4]. Estos últimos rompen el glóbulo rojo infectado, liberan entre 16 y 32 merozoitos e invaden nuevamente otros eritrocitos [11]. Este proceso se repite varias veces y es responsable de los signos y síntomas clínicos más característicos de la malaria, tales como fiebre, escalofríos, sudoración, anemia, cefalea, mialgias, malestar

general, debilidad y, en casos más graves, afectación visceral (espleno y hepatomegalia) [1].

Aunque históricamente se ha considerado que la infección por *P. vivax* es benigna, en los últimos años se ha demostrado que puede causar enfermedades graves, como el síndrome de dificultad respiratoria aguda, malaria cerebral, insuficiencia multiorgánica, diseritropoyesis, anemia y otras complicaciones hematológicas [12]. A pesar de su baja carga parasitaria, debido a la preferencia del parásito por infectar reticulocitos en lugar de glóbulos rojos maduros, la infección por *P. vivax* es capaz de provocar respuestas inflamatorias y síntomas clínicos como fiebre y escalofríos más intensos en comparación con *P. falciparum* [12].

Para que *P. vivax* penetre en las células sanguíneas del hospedador y se lleve a cabo el proceso infeccioso, necesita invadir los reticulocitos, a través de la interacción entre la proteína de unión a Duffy de *P. vivax* (PvDBP) y el receptor de antígeno Duffy hu-

mano para quimiocinas (DARC) [13]. Por lo tanto, el fenotipo Duffy negativo [Fy(a-b-)] ha sido identificado como un factor clave en la resistencia a la malaria causada por *P. vivax* [2]. Sin embargo, este paradigma ha sido cuestionado recientemente debido al aumento de casos reportados de infecciones clínicas de *P. vivax* en individuos con fenotipo Duffy negativo. Ahora se reconoce que el parásito tiene la capacidad de superar esta barrera y provocar malaria clínica, lo que sugiere la existencia de mecanismos alternativos de invasión que aún no se comprenden completamente [2]. En este contexto, el objetivo de este artículo es realizar una revisión de la literatura disponible hasta la fecha sobre los mecanismos de invasión de *P. vivax* en eritrocitos Duffy positivos. Asimismo, se analizarán los casos reportados de infección en individuos Duffy negativos, explorando las posibles vías alternativas mediante las cuales el parásito podría infectar a personas que carecen del receptor DARC.

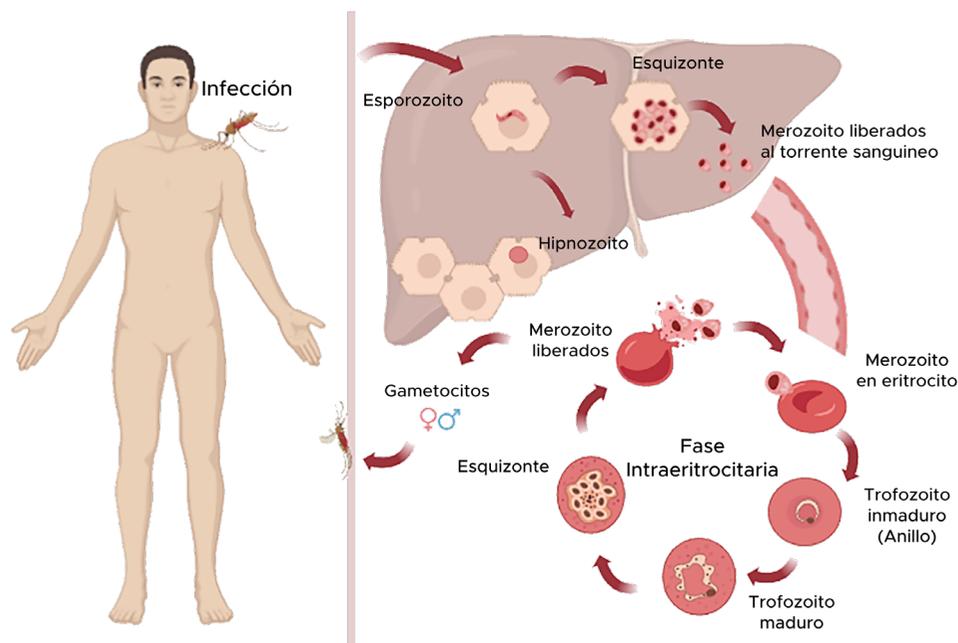


Figura 1. Ciclo de vida de *P. vivax*. El ciclo de *Plasmodium vivax* comienza cuando un mosquito hembra del género *Anopheles* pica a un humano e inyecta esporozoitos en su torrente sanguíneo. Estos se dirigen al hígado, donde invaden los hepatocitos y maduran, transformándose en esquizontes tisulares. Simultáneamente, algunos esporozoitos permanecen en estado latente como hipnozoitos, constituyendo una reserva capaz de reactivarse posteriormente. Al romperse los esquizontes hepáticos, liberan merozoitos que ingresan al torrente sanguíneo e invaden a los reticulocitos, donde se transforman en anillos, luego en trofozoitos y finalmente en esquizontes gametocitarios. Cuando estos esquizontes se rompen, liberan nuevos merozoitos. Una pequeña proporción de los parásitos se diferencia en gametocitos masculinos y femeninos, los cuales son ingeridos por un mosquito al alimentarse del humano. De este modo, el ciclo se perpetúa. **Figura creada por BioRender.com. [Ilustración].**

Metodología de la búsqueda bibliográfica

Se realizó una búsqueda de la literatura en las bases de datos electrónicas PubMed, LILACS y Google Scholar para identificar artículos originales y artículos de revisión utilizando los siguientes términos: “*Plasmodium vivax*”, “sistema de grupos sanguíneos Duffy”, “malaria”, “PvEBP”, “PvDBP” y “DARC”. La búsqueda se limitó a idiomas inglés y español, publicaciones realizadas entre enero de 2005 y abril de 2024.

El sistema Duffy y su relación con *P.vivax*.

El sistema Duffy fue identificado por primera vez en la década de 1960 en un paciente hemofílico multi transfundido [14]. Desde entonces, ha generado gran interés debido a su implicación en las reacciones transfusionales y su papel en la enfermedad hemolítica del recién nacido. Su producto génico, la glicoproteína Duffy, codificado por el gen FY, se expresa en varios tipos de células y actúa como antígeno eritrocitario y receptor de quimiocinas (de ahí el nombre de DARC) [15]. Su interés creció notablemente cuando se estableció su relación con la dependencia antigénica de *Plasmodium*, ya que la invasión de los reticulocitos humanos por *P. vivax* requiere la interacción del receptor del antígeno Duffy (DARC) y PvDBP [14].

Existen dos alelos principales conocidos para el gen Duffy: FY*A, que codifica el antígeno Fy(a), y el alelo ancestral FY*B, que codifica el antígeno Fy(b). De estos alelos, se derivan tres genotipos principales: FYA/FYA, FYB/FYB y FYA/FYB, resultando en tres fenotipos posibles asociados con los grupos sanguíneos: Fy(a+b-), Fy(a-b+) y Fy(a+b+), todos ellos son considerados Duffy-positivos. En contraste, el fenotipo Fy(a-b-) se clasifica como Duffy-negativo [16].

Esta diferencia se debe a la presencia de un polimorfismo en el promotor del gen que codifica para el antígeno Duffy, el cual interrumpe un sitio de unión para el factor de transcripción eritroide GATA-1, impidiendo la expresión de dicho antígeno en la superficie de los glóbulos rojos. Por lo anterior, se considera que las personas portadoras de esta condición presentan una notable resistencia a la malaria causada por *P. vivax* [15].

En este contexto, en estudios realizados entre 1920 y 1960, durante ensayos de tratamiento y experimentos de campo para combatir la fiebre palúdica y la neurosífilis, se observó que los africanos y afroamericanos mostraban una notable resistencia a la malaria en su fase sanguínea al ser expuestos a sangre humana infectada o a mosquitos portadores de *P. vivax* [4,17,19]. Estas observaciones, junto con la baja prevalencia de malaria por *P. vivax* en África, llevaron a Miller y colaboradores en 1970, a realizar estudios definitivos *in vivo*, en los que 17 voluntarios fueron expuestos al parásito, 11 hombres de raza negra y 6 caucásicos. Los resultados mostraron que sólo cinco individuos de raza negra, con el fenotipo Fy(a-b-), presentaron resistencia a la infección. En contraste, todos los demás participantes, que tenían fenotipos Duffy positivos (Fy(a+b+), Fy(a+b-), Fy(a-b+)), desarrollaron malaria, lo que demostró que la ausencia del antígeno Duffy confería protección frente a la infección experimental por *P. vivax* en su fase sanguínea [4,20]. En un estudio posterior, utilizando un sistema de cultivo *in vitro* con *P. knowlesi* (un parásito zoonótico estrechamente relacionado con *P. vivax*), se confirmó que la interacción entre el receptor DARC y los merozoitos de *P. vivax* es crucial para permitir la invasión de los reticulocitos [4,21].

Estos hallazgos han sido corroborados en diferentes poblaciones, incluyendo la colombiana. González y colaboradores analizaron la distribución del genotipo Duffy y la infección por *Plasmodium* spp. en función de la etnicidad en tres comunidades del municipio de San José del Palmar, La Italia (Chocó). En este estudio se evaluaron 320 voluntarios: 73 afrocolombianos, 74 amerindios y 171 mestizos. No se identificó ningún individuo FY- infectado por *P. vivax*; lo que refuerza la idea de una “resistencia natural” conferida por este fenotipo, principalmente a la invasión eritrocitaria [22]. A pesar de la considerable evidencia clínica y epidemiológica que muestra la protección contra *P. vivax* en individuos sin estos antígenos, nuevos estudios (Tabla 1) han planteado la posibilidad de infección por esta especie incluso en ausencia de la proteína Fy. Esta hipótesis sugiere que el parásito posiblemente ha desarrollado nuevos mecanismos de invasión para infectar a los eritrocitos.

Tabla 1. Casos reportados de Infección por *P. vivax* en individuos con Fenotipo Duffy Negativo.

Ubicación	Año	Participantes	Método Diagnóstico	Resultado	Referencia
Madagascar	2010	327 niños de origen africano 382 niños de origen asiático	Identificación: PCR - SSU Confirmación: PCR basadas en COI y/o PvDBP. Otros: Serología convencional Citometría de flujo Métodos de adsorción-elución	72% Genotipados Duffy negativos con 8,8% Infección por <i>P. vivax</i> en Duffy negativo.	[23]
Angola y Guinea Ecuatorial	2011	995 muestras de sangre de un total en siete aldeas de Angola y Guinea Ecuatorial	Identificación: Amplificación PCR anidada de los genes de rRNA de subunidades pequeñas; <i>P. vivax</i> se caracterizó además mediante el análisis del gen que codifica CSP. Genotipificación: PCR - RFLP, secuenciación.	8 casos de Guinea Ecuatorial y 7 de Angola en individuos Duffy negativos infectados por <i>P. vivax</i> .	[24]
Benín	2016	84 muestras seleccionadas de donantes de sangre	Identificación: PCR anidada, dirigida a una pequeña región (~120 pb) del gen <i>ssrRNA</i> Elisa Microscopia Genotipificación: PCR	13 casos de infección por <i>P. vivax</i> en individuos Duffy negativos.	[25]
Camerún	2017	484 muestras de sangre consecutivas de pacientes ambulatorios febriles del Hospital de Dschang (oeste de Camerún) durante un período de 3 meses.	Identificación: PCR anidada de fragmentos específicos del gen 18S rRNA. Genotipificación: PCR de perfil de curva de fusión; La PCR amplificó un fragmento de 178 pb (de la posición 186 a la 363, an	27 casos de infección por <i>P. vivax</i> en individuos Duffy negativos	[26]
Malí	2017	300 muestras de sangre de niños entre 1 a 6 años durante visitas programadas mensuales.	Identificación Ensayo cuantitativo de qPCR basado en cebadores dirigidos al del gen 18S rRNA. Genotipificación: PCR anidada de secuenciación	25 casos de infección por <i>P. vivax</i> en individuos Duffy negativos	[27]
Uganda	2017	449 muestras de niños entre 6 meses a 10 años de edad con síndromes clínicos sugestivos de malaria.	Identificación: Microscopía, RDT. Genotipificación: PCR anidada de secuenciación	4 casos de infección por <i>P. vivax</i> en individuos Duffy negativos	[28]
Brasil	2022	678 individuos (330 urbanos, 166 de Vencedora y 182 de Luciana)	Identificación: qPCR dirigidos a una secuencia ADNmt. Genotipificación: qPCR- ADNmt	2 casos de infección por <i>P. vivax</i> en individuos Duffy negativos.	[29]

Identificación: Técnicas empleadas para hacer el diagnóstico de *Plasmodium*. **Genotipificación:** Técnicas usadas para determinar el genotipo del antígeno Duffy. **PCR:** Reacción en Cadena de la polimerasa. **SSU:** Ensayo del ácido desoxirribonucleico recombinante (ADN_r) de subunidad pequeña. **COI:** Citocromo oxidasa. **rRNA:** Ácido ribonucleico ribosómico **CSP:** Proteína de superficie del circunsporozoito. **RFLP:** Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción. **ssrRNA:** Ácido ribonucleico de cadena sencilla. **qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. **RDT:** Pruebas de diagnóstico rápido. **ADNmt:** Ácido desoxirribonucleico mitocondrial.

Mecanismos de invasión en individuos duffy positivos

Al final del ciclo eritrocitario de *P. vivax*, los esquizontes se rompen y liberan merozoitos [16]. El merozoito recién liberado atraviesa varias fases para invadir los reticulocitos. Este proceso es rápido y ocurre en menos de 60 segundos [30]. Inicialmente, el merozoito se une a la superficie del reticulocito mediante interacciones específicas, facilitadas por una serie de proteínas ancladas a su superficie, conocidas como MSPs (Proteínas de Superficie del Merozoito) [4]. Basado en estudios de MSPs homólogos en *P. falciparum*, se destaca PvMSP1, una proteína que se sintetiza inicialmente como un precursor y se ancla a la superficie del merozoito mediante el glicofosfatidilinositol (GPI) [31,32]. Esta se ensambla en un complejo abundante con dos proteínas de membrana periféricas, MSP6 y MSP7 [31,32]. Los tres experimentan una serie de eventos de escisión proteolítica primaria [33,34]. Durante este proceso, el complejo que contiene MSP1 es liberado en forma soluble, mientras que la porción de MSP1 anclada al glicofosfatidilinositol (GPI) en su extremo C-terminal (MSP-1₄₂) permanece en la superficie del merozoito al ingresar al glóbulo rojo. Posteriormente, esta subunidad (MSP-1₄₂) puede dividirse y desprenderse, dejando únicamente una pequeña porción de la subunidad C-terminal, conocida como MSP-1₁₉, en la superficie del parásito [4,35]. En la **figura 2** se describe el mecanismo propuesto de invasión de *P. vivax* en individuos Duffy positivos.

Otros ligandos pueden estar implicados en este paso, pero se desconoce su capacidad para desencadenar la unión o el reconocimiento inhibido por el sistema inmunitario del hospedador [4]. La proteína PvTRAg56.2, por ejemplo, parece colocalizarse con PvMSP1 e interactuar molecularmente con PvMSP7, desempeñando un papel estabilizador en el complejo proteico en la superficie del merozoito [36]. De manera similar, la proteína micronemal antígeno de membrana apical de *P. vivax* (PvAMA), que posee un dominio transmembrana, se transfiere a la superficie del merozoito después de su liberación [4]. Tras la invasión de los glóbulos rojos, al igual que PvMSP1, PvAMA se desprende de la superficie por la acción de una proteasa, dejando solo una pequeña porción de su región C-terminal para ingresar a los glóbulos rojos [4].

Después de la adhesión inicial, *P. vivax* puede experimentar una reorientación apical que activa una serie de interacciones específicas entre los ligandos liberados desde organelos apicales especializados (roptrias y micronemas) y los receptores en la superficie del reticulocito, lo que refleja el marcado tropismo del parásito por estas células [4,37]. Los reticulocitos se pueden presentar en dos estadios principales: el primero tiene lugar en la médula ósea, donde se generan los reticulocitos R1, que son móviles y de forma irregular. Posteriormente, al pasar a la circulación sanguínea, estos reticulocitos R1 se transforman en reticulocitos R2, que son más estables y adquieren una forma definida [11].

A medida que maduran y se convierten en normocitos, los reticulocitos pierden varias proteínas de superficie, como CD71 (Receptor de Transferrina 1, TfR1), CD49d, CD151, CD81 y CD82, características de los reticulocitos jóvenes. En este contexto, mediante cultivos *ex vivo* a corto plazo, se ha observado que *P. vivax* presenta tasas de invasión más altas en reticulocitos con niveles elevados de TfR1, en comparación con aquellos que tienen niveles más bajos de esta proteína [38].

Plasmodium vivax tiene dos familias de proteínas que facilitan la unión a los eritrocitos (EBP): la proteína de unión a Duffy (PvDBP) y la familia de proteínas de unión a reticulocitos (PvRBP) [30,39]. Dado que TfR1 está presente en hasta un millón de copias por célula en los reticulocitos, se considera que podría ser un factor crucial para el reconocimiento preciso de los reticulocitos por *P. vivax* [30]. Aunque la interacción clásica PvDBP-DARC es necesaria para completar la invasión, varios estudios sugieren que las duplicaciones de PvDBP podrían permitir que el parásito utilice un receptor alternativo del hospedador en ausencia de DARC [30]. En consecuencia, el reconocimiento de los reticulocitos inmaduros por los merozoitos de *P. vivax* podrían estar mediados por PvRBP2a y/o PvRBP2b, posiblemente en conjunto con la proteína PvRBSA y las proteínas PvMSPs [16]. De esta manera, la vía TfR1-PvRBP2b podría actuar como un mecanismo alternativo que compense funcionalmente el PvDBP, especialmente en individuos Duffy-negativos [16]. Además, las proteínas PvRBPs podrían desempeñar un papel en etapas posteriores de la invasión, como la modulación del citoesqueleto de los eritrocitos, el ensamblaje de la unión estrecha o la señalización para la secreción de proteínas PvRhops [4].

Tras la reorientación apical, el merozoito forma una unión estrecha e irreversible con los reticulocitos en individuos Duffy-positivos, donde PvDBP se acopla a DARC en la región II, formando un heterotetrámero estable con dos moléculas de cada proteína [40,41]. El sitio de unión de la región II de PvDBP se localiza en los aminoácidos Ala8-Asp42 de la región N-terminal extracelular del receptor Duffy [4,42]. Aunque otros residuos extracelulares también son relevantes, la sulfatación de Tyr41 incrementa la afinidad de la interacción PvDBP-Duffy hasta 1000 veces, siendo esencial para la unión efectiva [4,43]. La formación de esta unión estrecha podría, además, ser facilitada por la secreción del ligando *P. vivax* Apical Membrane Antigen 1 (PvAMA1) en la superficie del merozoito, junto con la inyección de complejos de la proteína PvRON en la superficie de los reticulocitos y su posterior interacción [4,43]. En particular, se ha demostrado que PvRON5 tiene una marcada preferencia por los reticulocitos, lo que sugiere su implicación en el proceso de invasión [4]. Finalmente, también se considera que la expresión de varios miembros de la familia de proteínas 6-cisteína de *P. vivax* (PvP) en la superficie del merozoito desempeña un papel importante en este paso [4].

Mecanismos de invasión en individuos duffy negativos

En los individuos Duffy-negativos, los mecanismos y factores que facilitan la formación de la unión estrecha aún no se comprenden completamente. Actualmente, se están evaluando diversas hipótesis (Tabla 2),

particularmente a raíz del aumento de los casos notificados de infección por *P. vivax*. En este sentido, una de las hipótesis propuestas sugiere que, en estas poblaciones, la duplicación del gen *PvDBP* podría estar involucrada [44]. En Madagascar, se realizó un análisis que reveló la duplicación de este gen en aislados malgaches. Posteriores estudios de epidemiología molecular demostraron que esta duplicación también se observó en parásitos aislados de varias regiones geográficas, como América del Sur, África Oriental, Madagascar y el Asia-Pacífico [45]. Cabe destacar que la frecuencia más alta de aislamientos con duplicación del *PvDBP* (casi 53%) se detectó en Madagascar, en comparación con otras áreas, como Sudán (12,5%) y Camboya (9%) [45]. Se especula que esta duplicación podría haber sido seleccionada en esta región como una adaptación para superar la barrera de negatividad Duffy, posiblemente aumentando la cantidad de proteína *PvDBP* en la superficie del merozoito para facilitar su unión a un receptor desconocido de baja afinidad [45].

Una vez que los merozoitos de *P. vivax* se comprometen de manera irreversible en el proceso de invasión de los reticulocitos, utilizan el complejo de motilidad llamado glideosoma para penetrar y quedar encapsulados dentro de la vacuola parasitófora [4]. Aunque los detalles exactos de estos mecanismos aún no se comprenden completamente, se ha observado que las proteínas Pv TRAg36.6 y Proteínas asociadas a la membrana de la vacuola parasitófora de *Plasmodium* (Pv ETRAMP), localizadas en la región apical de los merozoitos, juegan un papel importante en la formación y/o mantenimiento de la membrana de la vacuola parasitófora [36].

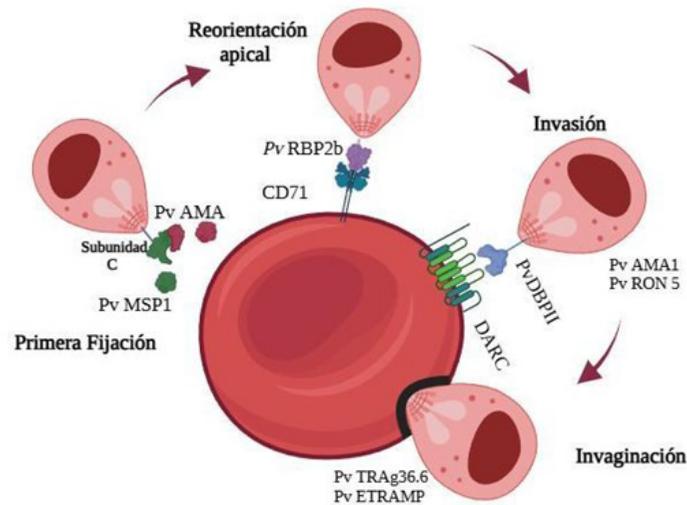


Figura 2. Invasión celular de *P. vivax* en individuos Duffy positivos. El proceso de invasión del parásito de la malaria inicia con la adhesión del merozoito a la célula hospedadora, mediada por proteínas como PvAMA y PvMSP1. Estas experimentan una escisión proteolítica donde la porción C-terminal, anclada a la membrana por un GPI, permanece en la superficie. Posteriormente, el merozoito reorienta su polo apical, facilitando la interacción con proteínas como PvRBP2b y CD71. Una vez establecida una unión irreversible, mediada por proteínas como PvDBP1 y DARC, el merozoito utiliza el complejo de motilidad glideosoma para penetrar en la célula. Finalmente, el parásito queda encapsulado dentro de la vacuola parasitófora, gracias a la interacción de proteínas como Pv TRAg36.6 y Pv ETRAMP. **Figura creada por BioRender.com. [Ilustración]. Tomado y modificado de:** [20].

Adaptabilidad evolutiva y nuevas estrategias del parásito

La microscopía electrónica de transmisión ha mostrado que los merozoitos se mantienen a cierta distancia de los eritrocitos Duffy negativos, extendiendo hebras hacia estas células, pero sin lograr establecer una unión efectiva [46]. Para que el merozoito invada el glóbulo rojo, es esencial que la proteína DBP1 y el dominio de unión Duffy (región II), se una de manera específica al antígeno Duffy. Sin embargo, ni la proteína DBP1, ni el dominio de la región II se unen a los eritrocitos Duffy negativos, lo que explica la incapacidad de *P. vivax* para infectar a individuos africanos Duffy negativos por la vía DARC [46].

En relación con este fenómeno, se han identificado varias mutaciones en el dominio de unión de la región II de la proteína DBP1 [47]. Con el fin de investigar si estas mutaciones permitían que *P. vivax* se uniera a los eritrocitos Duffy negativos, se realizó un estudio con parásitos de *P. vivax* obtenidos de dos individuos Duffy negativos en Etiopía, una región donde

coexisten poblaciones de africanos Duffy negativos y Duffy positivos. Los resultados mostraron que, aunque los DBP1 de estos parásitos presentaban secuencias únicas, no lograban unirse a los eritrocitos Duffy negativos. Esto sugiere que las mutaciones en DBP1 no son responsables de la capacidad de *P. vivax* para infectar a los individuos africanos Duffy negativo [47]. ¿Cómo logra *P. vivax* invadir glóbulos rojos Duffy-negativos? ¿Qué receptor utiliza para entrar en estos eritrocitos? ¿Ha desarrollado *P. vivax* estrategias recientes para infectar glóbulos rojos Duffy-negativos, o ya existían vías alternativas de invasión? Aún no se dispone de una respuesta definitiva a estos interrogantes, ya que diversos obstáculos limitan los estudios funcionales necesarios para identificar y caracterizar los componentes de una vía alternativa que permita a *P. vivax* invadir reticulocitos Duffy-negativos. Esta situación se ve agravada por la falta de un sistema eficaz de cultivo *in vitro* para esta especie, lo que ha llevado a que se generen varias hipótesis (Tabla 2) [16]. En la figura 3, se proponen algunos mecanismos de invasión de eritrocitos de individuos Duffy negativos por *P. vivax*.

Tabla 2. Hipótesis de la invasión celular de *P. vivax* en individuos Duffy negativos.

Hipótesis	Descripción	Evidencia Científica	Consideraciones
Duplicación del gen PvDBP	Se ha observado una duplicación del gen PvDBP en aislados de <i>P. vivax</i> provenientes de diversas regiones, incluyendo Madagascar, África Oriental, América del Sur, Tailandia, el Oeste de Camboya y Papúa Indonesia. Esta duplicación podría permitir a la proteína PvDBP aumentar su cantidad en la superficie del merozoito, lo que facilitaría la interacción con receptores alternativos de baja afinidad en eritrocitos Duffy-negativos [45,48,49].	En estudios de WGS (secuenciación de genoma completo) en aislados de Madagascar, Sudán y Camboya, se encontró que la duplicación de PvDBP estaba presente en hasta el 53% de los parásitos de Madagascar en comparación con otras áreas como Sudán (12,5%) y Camboya (9%) (6,7,8) [44].	Aunque la duplicación de PvDBP se encuentra en algunas regiones, no se ha demostrado que esta duplicación sea suficiente para permitir la invasión de eritrocitos Duffy-negativos por sí sola. Se requiere más investigación sobre su función adaptativa.
Variación en el número de copias de PvDBP.	La amplificación de PvDBP podría ser seleccionada para aumentar la afinidad de la proteína a los eritrocitos que expresan el alelo FY*A. Sin embargo, no se ha encontrado una correlación definitiva entre la duplicación del gen PvDBP y la invasión de eritrocitos Duffy-negativos [45].	Un estudio de epidemiología molecular en <i>P. vivax</i> etíope y camboyanos. La amplificación de PvDBP se observó en un porcentaje mayor en parásitos de individuos con el alelo FY*A [45]. Los estudios <i>in vitro</i> han demostrado que la unión de PvDBP al alelo FY*A se ve reducida en comparación con la unión al alelo FY*B [50].	A pesar de que la duplicación de PvDBP está presente en algunos casos, los estudios han mostrado que la amplificación no parece estar relacionada con la capacidad de invadir eritrocitos Duffy-negativos.
Interacción con proteínas de unión a reticulocitos (PvRBPs)	Las proteínas PvRBPs, como PvRBP1a y PvRBP2c, muestran la capacidad de unirse a reticulocitos Duffy-negativos. Estas proteínas pueden ser cruciales para el proceso de invasión de eritrocitos Duffy-negativos, independientemente de la presencia del receptor Duffy [11,51].	Estudios sobre la unión de PvRBP1a y PvRBP2c a eritrocitos Duffy-negativos. La unión fue detectada, indicando su posible papel en la invasión alternativa [11].	Los ligandos PvRBPs parecen ser una vía importante en la invasión de eritrocitos Duffy-negativos, pero aún es necesario realizar más investigaciones para comprender completamente su papel en la invasión del parásito.
Invasión a través de otros ligandos y proteínas de la superficie del merozoito	Proteínas como PvMSP1P y PvGAMA, que se encuentran en la superficie del merozoito, también han demostrado interactuar con eritrocitos tanto Duffy-negativos como Duffy-positivos. Estas proteínas podrían estar involucradas en vías alternativas de invasión [52,53].	Estudio sobre la interacción de PvMSP1P y PvGAMA con eritrocitos Duffy-negativos. Los anticuerpos contra estas proteínas bloquean la invasión en modelos experimentales [53].	Estas proteínas podrían representar nuevas vías de invasión para <i>P. vivax</i> en individuos Duffy-negativos, pero se necesita confirmación funcional para evaluar su relevancia.
Amplificación de PvEBP (PvDBP2)	La proteína PvEBP, también conocida como PvDBP2, ha demostrado cierta afinidad por los eritrocitos Duffy-negativos. La amplificación de PvEBP en parásitos malgaches podría estar relacionada con la adaptación a las poblaciones Duffy-negativas [54].	Estudio de amplificación de PvEBP en Madagascar. Se detectaron hasta cinco copias de PvEBP en los parásitos aislados de individuos Duffy-negativos [54].	La amplificación de PvEBP podría ser una estrategia adicional de adaptación para la invasión de eritrocitos Duffy-negativos. No obstante, se requiere mayor investigación funcional.
Otros posibles ligandos de invasión alternativos	Se están investigando otros ligandos potenciales que podrían involucrarse en la invasión de eritrocitos Duffy-negativos, pero aún no se han identificado con certeza [55].	No se han identificado claramente, pero los estudios en proteínas de la superficie del merozoito y otras proteínas de unión al reticulocito siguen en curso [55].	Se necesita investigar más a fondo estos ligandos potenciales para entender mejor cómo <i>P. vivax</i> puede invadir eritrocitos Duffy-negativos sin depender exclusivamente del receptor Duffy.

PvMSP1P: Parálogo de la proteína de superficie 1 del merozoito de *P. vivax*. **PvGAMA:** Antígeno de merozoito anclado a glicosilfosfatidilinositol de *Plasmodium vivax*.

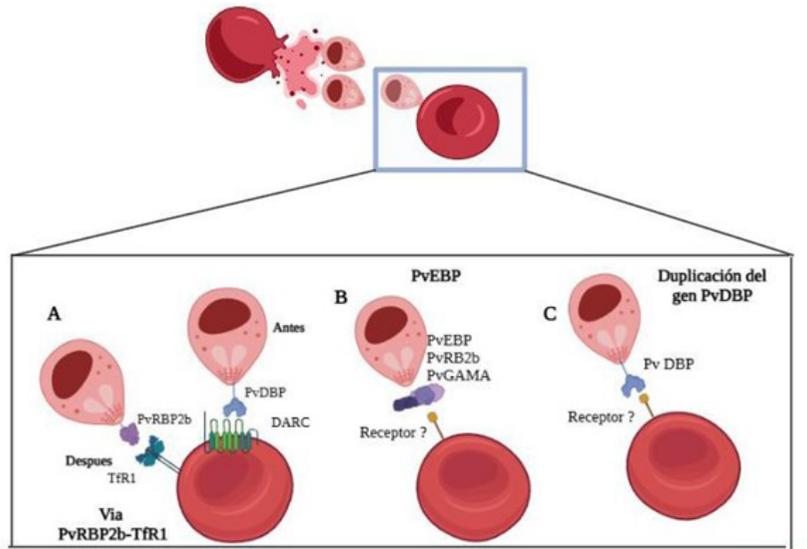


Figura 3. Desafiando el paradigma: ¿cómo invade *P. vivax* a individuos Duffy negativos? Se creía que la ausencia del antígeno Duffy confería inmunidad contra *Plasmodium vivax*. No obstante, el parásito ha evolucionado, y su adaptación se explica por tres teorías hipotéticas: **A.** En individuos Duffy-negativos, donde la interacción clásica PvDBP-DARC no ocurre, el par Tfr1-PvRBP2b proporciona un camino alternativo para que el merozoito reconozca y se adhiera a los reticulocitos inmaduros junto con otras proteínas como PvRBSA y PvMSPs. **B.** El ligando PvEBP podría actuar como una alternativa en la invasión de reticulocitos Duffy-negativos debido a sus similitudes estructurales con PvDBP, incluyendo un sitio de unión a Duffy y un dominio C-terminal con cisteínas conservadas. Además, este receptor también interactúa con otras proteínas del merozoito, como PvRBP2b o PvGAMA. **C.** Una hipótesis alternativa propone que el mayor nivel de PvDBP en el merozoito podría permitir la unión a un receptor celular desconocido, caracterizado por una baja afinidad. **Figura creada por BioRender.com. [Ilustración].**

Implicaciones en salud pública y conclusiones.

Plasmodium vivax presenta características biológicas que lo hacen particularmente resistente a las estrategias de control convencionales. Su capacidad para invadir reticulocitos, la formación de hipnozoitos, la baja parasitemia y su alto potencial de transmisión debido a la producción temprana y abundante de gametocitos, lo convierten en un desafío significativo para la eliminación de la malaria [14,56]. Además, el acceso limitado a material biológico y la falta de sistemas robustos para el cultivo *in vitro* han obstaculizado el desarrollo de estudios funcionales, lo que genera incertidumbre sobre los mecanismos de invasión y el desarrollo del parásito dentro del eritrocito [57,58].

Hasta ahora, se ha descrito principalmente la interacción entre la proteína de unión a Duffy (PvDBP) y el receptor del antígeno Duffy para quimiocinas como el principal mecanismo de invasión de *P. vivax*. Sin embargo, se han reportado casos de infección en individuos Duffy-negativos en países como Madagas-

car, Angola, Guinea Ecuatorial, Benín y Camerún, lo que sugiere que el parásito podría utilizar una vía de invasión alternativa y flexible. En este sentido, se han planteado varias hipótesis, tales como la duplicación del gen PvDBP, que, al aumentar la cantidad de proteína en la superficie del merozoito facilita su unión con un receptor desconocido de baja afinidad. Además, la interacción Tfr1-PvRBP2b podría proporcionar un camino alternativo para que el merozoito reconozca y se adhiera a los reticulocitos inmaduros, en conjunto con otras proteínas como PvRBSA y PvMSPs. Por otro lado, el ligando PvEBP podría actuar como una alternativa en la invasión de reticulocitos Duffy-negativos, junto con otras proteínas como PvRBP2b y PvGAMA, dada su similitud estructural con PvDBP. Esto, sumado a la creciente movilidad humana, ha transformado significativamente el panorama epidemiológico de la malaria, incrementado el riesgo para poblaciones previamente consideradas seguras y ha complicado los esfuerzos globales para la eliminación de la enfermedad [4].

Comprender cómo *P. vivax* reconoce e invade los eritrocitos es esencial para identificar nuevos blancos terapéuticos y desarrollar estrategias efectivas para interrumpir su ciclo de vida en la fase sanguínea [11]. En este contexto, PvDBPII es la única vacuna candidata que ha avanzado a la fase 1b de ensayos clínicos y desempeña un papel importante en la invasión de merozoitos de *P. vivax* a los reticulocitos humanos [59]. Sin embargo, una vacuna dirigida exclusivamente a un antígeno del parásito en una sola etapa enfrenta desafíos para mantener respuestas de anticuerpos duraderas, debido a los cambios genómicos en los ligandos del parásito, al aumento en el reporte de infecciones en individuos Duffy-negativos y la creciente evidencia de nuevos antígenos (como PvRBP y PvEBP) involucrados en este proceso, lo que pone en duda la viabilidad de esta estrategia [59].

Fuente de financiación

Al ser un artículo de revisión no se requirió financiación externa.

Conflictos de interés

Los autores informan que no existe conflicto de interés

Referencias

- [1] **de Carvalho GB, de Carvalho GB.** *Duffy blood group system and the malaria adaptation process in humans.* Rev Bras Hematol Hemoter 2011;33. <https://doi.org/10.5581/1516-8484.20110016>.
- [2] **Picón-Jaimes YA, Lozada-Martinez ID, Buelvas MCF, Sarmiento AFA, Baez GAS, Erazo DYN, et al.** Evolution of *Plasmodium vivax* and resistance patterns for infection based on Duffy genotype and phenotype. Infezioni in Medicina 2023;31:350–8. <https://doi.org/10.53854/liim-3103-8>.
- [3] **Loy DE, Liu W, Li Y, Learn GH, Plenderleith LJ, Sundararaman SA, et al.** Out of Africa: origins and evolution of the human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. Int J Parasitol 2017;47. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.05.008>.
- [4] **Bouyssou I, Martínez FJ, Campagne P, Ma L, Doderer-Lang C, Chitnis CE, et al.** *Plasmodium vivax* blood stage invasion pathways: Contribution of omics technologies in deciphering molecular and cellular mechanisms. C R Biol 2022;345:91–133. <https://doi.org/10.5802/crbio.95>.
- [5] **Culleton R, Carter R.** African *Plasmodium vivax*: Distribution and origins. Int J Parasitol 2012;42. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.08.005>.
- [6] **Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al.** Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. Lancet Infect Dis 2009;9. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70177-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70177-X).
- [7] **Bermúdez M, Moreno-Pérez DA, Arévalo-Pinzón G, Curtidor H, Patarroyo MA.** *Plasmodium vivax* in vitro continuous culture: The spoke in the wheel. Malar J 2018;17. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2456-5>.
- [8] **Martínez Santander C ACCCSLCVHRAK.** Malaria: Un problema de alta prevalencia en habitantes de regiones tropicales de Latinoamérica. Ateneo 2023;25(2):110–28.
- [9] **Organización Mundial de la Salud/ Organización Panamericana de la Salud.** Malaria. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria> 2023.
- [10] **INS-Boletín epidemiológico semanal.** Semana epidemiológica 52; 24 al 30 de diciembre de 2023. 2023.
- [11] **Chan LJ, Dietrich MH, Nguitragool W, Tham WH.** *Plasmodium vivax* Reticulocyte Binding Proteins for invasion into reticulocytes. Cell Microbiol 2020;22. <https://doi.org/10.1111/cmi.13110>.
- [12] **Dayananda KK, Achur RN, Gowda DC.** Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of *Plasmodium vivax* malaria. J Vector Borne Dis 2018;55. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.234620>.
- [13] **Golassa L, Amenga-Etego L, Lo E, Amambua-Ngwa A.** The biology of unconventional invasion of Duffy-negative reticulocytes by *Plasmodium vivax* and its implication in malaria epidemiology and public health. Malar J 2020;19. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03372-9>.
- [14] **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;2:266. <https://doi.org/10.1038/ncomms1265>.
- [15] **Kwiatkowski , Dominic P.** How Malaria Has Affected the Human Genome and What Human Genetics Can Teach Us about Malaria . The American Journal of Human Genetics n.d.;77.
- [16] **Popovici J, Roesch C, Rougeron V.** The enigmatic mechanisms by which *Plasmodium vivax* infects Duffy-negative individuals. PLoS Pathog 2020;16. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008258>.
- [17] **BRAY RS.** The susceptibility of Liberians to the Madagascar strain of *Plasmodium vivax*. J Parasitol 1958;44. <https://doi.org/10.2307/3274317>.

- [18] Ellis JM, Stubbs TH, Young MD. Some Characteristics of Foreign Vivax Malaria Induced in Neurosyphilitic Patients 1,2. *Am J Trop Med Hyg* 1947;s1-27:585–96. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1947.s1-27.585>.
- [19] Young MD, Eyles DE, Burgess RW, Jeffery GM. Experimental Testing of the Immunity of Negroes to *Plasmodium vivax*. *J Parasitol* 1955;41:315. <https://doi.org/10.2307/3274214>.
- [20] Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The Resistance Factor to *Plasmodium vivax* in Blacks. The Duffy Blood Group Genotype, FyFy. *N Engl J Med* 1976;295.
- [21] Barnwell JW, Nichols ME, Rubinstein P. In vitro evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. *J Exp Med* 1989;169:1795–802. <https://doi.org/10.1084/jem.169.5.1795>.
- [22] Gonzalez L, Vega J, Ramirez JL, Bedoya G, Carmona-Fonseca J, Maestre A. Relationship between genotypes of the Duffy blood groups and malarial infection in different ethnic groups of Choco, Colombia. *Colomb Med (Cali)* 2012;43:189–95.
- [23] Ménard D, Barnadas C, Bouchier C, Henry-Halldin C, Gray LR, Ratsimbaoa A, et al. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:5967–71. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912496107>.
- [24] Mendes C, Dias F, Figueiredo J, Mora VG, Cano J, de Sousa B, et al. Duffy Negative Antigen Is No Longer a Barrier to *Plasmodium vivax* – Molecular Evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea). *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:e1192. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001192>.
- [25] Poirier P, Doderer-Lang C, Atchade PS, Lemoine J-P, de l'Isle M-LC, Abou-bacar A, et al. The hide and seek of *Plasmodium vivax* in West Africa: report from a large-scale study in Beninese asymptomatic subjects. *Malar J* 2016;15:570. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1620-z>.
- [26] Russo G, Faggioni G, Paganotti GM, Djeunang Dongho GB, Pomponi A, De Santis R, et al. Molecular evidence of *Plasmodium vivax* infection in Duffy negative symptomatic individuals from Dschang, West Cameroon. *Malar J* 2017;16:74. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1722-2>.
- [27] Niangaly A, Gunalan K, Ouattara A, Coulibaly D, Sá JM, Adams M, et al. *Plasmodium vivax* Infections over 3 Years in Duffy Blood Group Negative Malians in Bandiagara, Mali. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2017;97. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0254>.
- [28] Asua V, Tukwasibwe S, Conrad M, Walakira A, Nankabirwa JI, Mugenyi L, et al. *Plasmodium* Species Infecting Children Presenting with Malaria in Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 2017;97:753–7. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0345>.
- [29] Carvalho TA, Queiroz MG, Cardoso GL, Diniz IG, Silva AN, Pinto AY, et al. *Plasmodium vivax* infection in Anajás, State of Pará: no differential resistance profile among Duffy-negative and Duffy-positive individuals. *Malar J* 2012;11:430. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-430>.
- [30] Kanjee U, Rangel GW, Clark MA, Duraisingh MT. Molecular and cellular interactions defining the tropism of *Plasmodium vivax* for reticulocytes. *Curr Opin Microbiol* 2018;46. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.10.002>.
- [31] Kadekoppala M, Holder AA. Merozoite surface proteins of the malaria parasite: The MSP1 complex and the MSP7 family. *Int J Parasitol* 2010;40:1155–61. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.04.008>.
- [32] Molina-Franky J, Reyes C, Picón Jaimes YA, Kalkum M, Patarroyo MA. The Black Box of Cellular and Molecular Events of *Plasmodium vivax* Merozoite Invasion into Reticulocytes. *Int J Mol Sci* 2022;23. <https://doi.org/10.3390/ijms232314528>.
- [33] Pachebat JA, Kadekoppala M, Grainger M, Dluzewski AR, Gunaratne RS, Scott-Finnigan TJ, et al. Extensive proteolytic processing of the malaria parasite merozoite surface protein 7 during biosynthesis and parasite release from erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* 2007;151:59–69. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.10.006>.
- [34] Douglas NM, Anstey NM, Buffet PA, Poespoprodjo JR, Yeo TW, White NJ, et al. The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J* 2012;11:135. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-135>.
- [35] Dluzewski AR, Ling IT, Hopkins JM, Grainger M, Margos G, Mitchell GH, et al. Formation of the Food Vacuole in *Plasmodium falciparum*: A Potential Role for the 19 kDa Fragment of Merozoite Surface Protein 1 (MSP119). *PLoS One* 2008;3:e3085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003085>.
- [36] Tyagi K, Hossain ME, Thakur V, Aggarwal P, Malhotra P, Mohammed A, et al. *Plasmodium vivax* Tryptophan Rich Antigen PvTRAg36.6 Interacts with PvETRAMP and PvTRAg56.6 Interacts with PvMSP7 during Erythrocytic Stages of the Parasite. *PLoS One* 2016;11:e0151065. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151065>.
- [37] Molina-Franky J, Reyes C, Picón Jaimes YA, Kalkum M, Patarroyo MA. The Black Box of Cellular and Molecular Events of *Plasmodium vivax* Merozoite Invasion into Reticulocytes. *Int J Mol Sci* 2022;23. <https://doi.org/10.3390/ijms232314528>.
- [38] Malleret B, Li A, Zhang R, Tan KSW, Suwanarusk R, Claser C, et al. *Plasmodium vivax*: restricted tropism and rapid remodeling of CD71-positive reticulocytes. *Blood* 2015;125:1314–24. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-08-596015>.

- [39] **Adams JH, Hudson DE, Torii M, Ward GE, Wellems TE, Aikawa M, et al.** The duffy receptor family of plasmodium knowlesi is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. *Cell* 1990;63:141–53. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90295-P](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90295-P).
- [40] **Chitnis CE, Miller LH.** Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. *J Exp Med* 1994;180:497–506. <https://doi.org/10.1084/jem.180.2.497>.
- [41] **Mercereau-Puijalon O, Ménard D.** Plasmodium vivax and the Duffy antigen: A paradigm revisited. *Transfusion Clinique et Biologique* 2010;17:176–83. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2010.06.005>.
- [42] **Chitnis CE, Chaudhuri A, Horuk R, Pogo AO, Miller LH.** The domain on the Duffy blood group antigen for binding *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* malarial parasites to erythrocytes. *J Exp Med* 1996;184:1531–6. <https://doi.org/10.1084/jem.184.4.1531>.
- [43] **Choe H, Moore MJ, Owens CM, Wright PL, Vasilieva N, Li W, et al.** Sulphated tyrosines mediate association of chemokines and *Plasmodium vivax* Duffy binding protein with the Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC). *Mol Microbiol* 2005;55:1413–22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04478.x>.
- [44] **Lo E, Hostetler JB, Yewhalaw D, Pearson RD, Hamid MMA, Gunalan K, et al.** Frequent expansion of *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein in Ethiopia and its epidemiological significance. *PLoS Negl Trop Dis* 2019;13:e0007222. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007222>.
- [45] **Menard D, Chan ER, Benedet C, Ratsimbaoa A, Kim S, Chim P, et al.** Whole Genome Sequencing of Field Isolates Reveals a Common Duplication of the Duffy Binding Protein Gene in Malagasy *Plasmodium vivax* Strains. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7:e2489. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002489>.
- [46] **Gunalan K, Niangaly A, Thera MA, Doumbo OK, Miller LH.** Plasmodium vivax Infections of Duffy-Negative Erythrocytes: Historically Undetected or a Recent Adaptation? *Trends Parasitol* 2018;34. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.02.006>.
- [47] **Gunalan K, Lo E, Hostetler JB, Yewhalaw D, Mu J, Neafsey DE, et al.** Role of *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein 1 in invasion of Duffy-null Africans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2016;113:6271–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606113113>.
- [48] **Auburn S, Getachew S, Pearson RD, Amato R, Miotto O, Trimarsanto H, et al.** Genomic Analysis of *Plasmodium vivax* in Southern Ethiopia Reveals Selective Pressures in Multiple Parasite Mechanisms. *J Infect Dis* 2019;220:1738–49. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz016>.
- [49] **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;48:959–64. <https://doi.org/10.1038/ng.3599>.
- [50] **King CL, Adams JH, Xianli J, Grimberg BT, McHenry AM, Greenberg LJ, et al.** Fy^a/Fy^b antigen polymorphism in human erythrocyte Duffy antigen affects susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011;108:20113–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109621108>.
- [51] **Galinski MR, Medina CC, Ingravallo P, Barnwell JW.** A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites. *Cell* 1992;69:1213–26. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90642-P](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90642-P).
- [52] **Cheng Y, Lu F, Wang B, Li J, Han J-H, Ito D, et al.** Plasmodium vivax GPI-anchored micronemal antigen (PvGAMA) binds human erythrocytes independent of Duffy antigen status. *Sci Rep* 2016;6:35581. <https://doi.org/10.1038/srep35581>.
- [53] **Han J-H, Cheng Y, Muh F, Ahmed MA, Cho J-S, Nyunt MH, et al.** Inhibition of parasite invasion by monoclonal antibody against epidermal growth factor-like domain of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 paralog. *Sci Rep* 2019;9:3906. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40321-2>.
- [54] **Roesch C, Popovici J, Bin S, Run V, Kim S, Ramboarina S, et al.** Genetic diversity in two *Plasmodium vivax* protein ligands for reticulocyte invasion. *PLoS Negl Trop Dis* 2018;12:e0006555. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006555>.
- [55] **Gupta S, Singh S, Popovici J, Roesch C, Shakri AR, Guillotte-Blisnick M, et al.** Targeting a Reticulocyte Binding Protein and Duffy Binding Protein to Inhibit Reticulocyte Invasion by *Plasmodium vivax*. *Sci Rep* 2018;8:10511. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28757-4>.
- [56] **Bermúdez M, Moreno-Pérez DA, Arévalo-Pinzón G, Curtidor H, Patarroyo MA.** *Plasmodium vivax* in vitro continuous culture: the spoke in the wheel. *Malar J* 2018;17:301. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2456-5>.
- [57] **Roobsoong W, Tharinjaroen CS, Rachaphaew N, Chobson P, Schofield L, Cui L, et al.** Improvement of culture conditions for long-term in vitro culture of *Plasmodium vivax*. *Malar J* 2015;14:297. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0815-z>.
- [58] **Russell B, Suwanarusk R, Borlon C, Costa FTM, Chu CS, Rijken MJ, et al.** A reliable ex vivo invasion assay of human reticulocytes by *Plasmodium vivax*. *Blood* 2011;118:e74–81. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-348748>.
- [59] **Kar S, Sinha A.** *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein-Based Vaccine: a Distant Dream. *Front Cell Infect Microbiol* 2022;12:916702. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.916702>.