

INTRODUCCIÓN

La malaria o paludismo es una infección febril aguda, crónica o recurrente causada por un protozoo Apicomplexa hemotísular del género *Plasmodium*, transmitida por la picadura de un mosquito *Anopheles* (hembra) infectado (Rodak, 2004, Bruce-Chwatt, 1986).

Actualmente, cinco especies de *Plasmodium* infectan al hombre, *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi* ya que, recientemente se han descrito infecciones en humano por *P. knowlesi*, un parásito de mono que aparece en zonas boscosas de Asia Sudoriental; de éstas las más frecuentes son por *P. falciparum* y *P. vivax* (Organización Mundial de la Salud, 2013).

La incidencia de malaria en el mundo, de acuerdo con los datos reportados para 2013, fue de aproximadamente 198 millones de casos (124 - 283 millones) que ocasionaron la muerte a 584.000 personas (367.000 - 755.000). En la Región Africana, el 90% de las muertes es causada por malaria y el 78% de las muertes ocurrieron en los niños menores a 5 años (OMS, 2014).

En Venezuela el área malárica está representada por 3 focos: **Meridional** (Bolívar: Amazonas, parte oriental de Apure y Delta Amacuro) donde circulan *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. malariae*. **Occidental** (Táchira, Zulia, Barinas, Trujillo y parte occidental de Apure, Yaracuy, Portuguesa y Mérida) en el cual está presente *P. vivax* y **Oriental**: (Sucre, Monagas, Anzoátegui, y Delta Amacuro) circulando solo *P. vivax*. En la semana epidemiológica N° 36, se registraron 2.551 autóctonos (98,6%) y 37 casos (1,4%) importados del exterior (Guyana $\eta=14$ y Colombia $\eta=23$) y el acumulativo es de 90.976 casos. La fórmula parasitaria de la casuística originada en el territorio nacional fue 74,6% a

Plasmodium vivax, 15,3% a *Plasmodium falciparum* y 10,1% Infecciones Mixtas (*P. vivax* + *P. falciparum*). El estado Bolívar, reportó 90,3% de la casuística nacional ($\eta=2.304$). Los municipios con mayor IPA son: Sifontes (Bol) (1.975,2), El Callao (Bol) (201,6), Gran Sabana (Bol) (141,4), Angostura (Bol) (127,5), Sucre (Bol) (89,6), Cedeño (Bol) (74,5) y Autana (Ama) (71,4). (Boletín Integral de Salud Ambiental, Semana N° 36- Dirección General de Salud Ambiental-MPPS, 2015).

Ciclo de vida de *Plasmodium* spp

Plasmodium es un parásito intracelular obligatorio, que requiere de un hospedador vertebrado (Ej. el humano) y otro invertebrado (mosquito *Anopheles*) para completar su desarrollo. En este sentido el ciclo de vida de *Plasmodium* spp. (Fig.1) da inicio cuando el parásito, en su forma evolutiva infectante (esporozoito) es inoculado en la sangre del hospedador vertebrado a través de la picadura del vector, de forma que tras circular unos 30-60 minutos en la sangre, los esporozoitos invaden las células hepáticas dando inicio al ciclo exoeritrocítico o pre-eritrocítico. Dentro de los hepatocitos, cada esporozoito se divide asexualmente hasta diferenciarse en merozoitos, contenidos en esquizontes hepáticos, éstos se rompen y los merozoitos son liberados a la sangre e infectan los glóbulos rojos destruyéndolos en un proceso cíclico. Esto ocurre en *P. falciparum* y *P. malariae*, Sin embargo, en el caso de *P. vivax* y *P. ovale* algunos esporozoitos no desarrollan la esquizogonia habitual permaneciendo en forma “latente” en los hepatocitos durante meses e incluso años (dependiendo del aislado), este estadio se denomina “hipnozoíto”. En un tiempo determinado los hipnozoitos (todos o algunos de ellos) continúan la esquizogonia exoeritrocítica clásica que conlleva a una nueva ola de merozoitos que invaden los glóbulos rojos para continuar con la fase eritrocítica (Carnevale e Izri, 2013). Como resultado de esta fase cíclica algunos merozoitos se diferencian a las formas sexuales (gametocitos). El ciclo

continúa cuando otro mosquito “sano” pica al hospedador infectado e ingiere gametocitos (junto con la sangre de alimentación), estos llegan al aparato digestivo del mosquito donde ocurre la fase esporogónica (reproducción sexual), sólo los gametocitos continúan su desarrollo diferenciándose en gametos macho y hembra. Luego ocurre la fecundación originando un cigoto móvil (ooquineto) y por sucesivas divisiones celulares se forman los esporozoitos (contenidos en ooquistes), estos caen al hemocele del insecto y se almacenan en las glándulas salivales, finalmente completan el ciclo cuando un mosquito infectado pica a otro vertebrado (Bruce-Chwatt, 1986, Mueller y col., 2009, Klein, 2013).

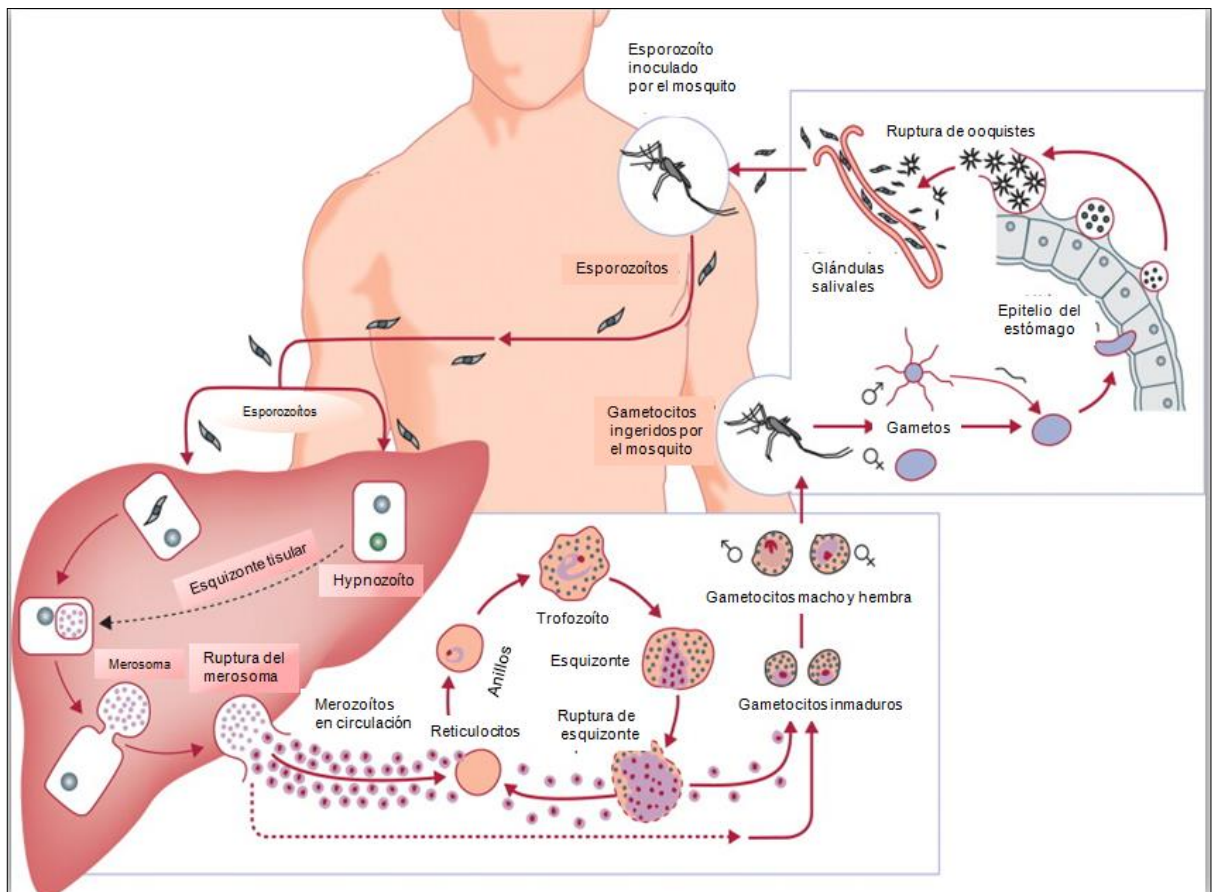


Fig. 1. Ciclo de vida de *Plasmodium vivax*. (Mueller y col., 2009)

Manifestaciones clínicas de la malaria

Los síntomas clásicos de esta enfermedad son: episodios de fiebre intermitente precedida por escalofríos y seguida de sudoración profusa (acceso malárico), cefalea, malestar general, astenia, anorexia, náuseas y vómitos y entre los signos clínicos destacan la palidez, hepato-esplenomegalia y la hipotensión. Clásicamente se ha descrito que la periodicidad de la fiebre es cada 48 horas en *P. falciparum* (fiebre terciana maligna) y *P. vivax* (fiebre terciana benigna) y cada 72 horas en *P. malariae* (fiebre cuartana), sin embargo, al inicio de la enfermedad no necesariamente se presenta este patrón, hasta tanto no ocurre la sincronización de los parásitos de la fase esquizogónica eritrocítica, habitualmente es más tardía en *P. falciparum* (Noya y Ossenkopp, 2011).

Diagnóstico y Tratamiento de la malaria

El diagnóstico de la malaria es convencionalmente integrado: clínico, epidemiológico y de laboratorio, éste a su vez incluye los métodos de diagnóstico parasitológico, inmunológico y de biología molecular (Alger, 1999; Wide y col., 2011).

De manera que el diagnóstico parasitológico, se fundamenta en la detección del parásito en sangre del paciente, basado en las características morfológicas del mismo. En cuanto al diagnóstico inmunológico se basa en la detección de anticuerpos contra el parásito y/o antígenos propios del metabolismo del parásito circulantes en la sangre u otros fluidos corporales (plasma y orina). El diagnóstico molecular a través de la reacción en cadena de la polimerasa se fundamenta en la detección de ADN del parásito utilizando los genes blanco de la subunidad 18S ARNr; en cuanto a la diferenciación entre especies se utilizan genes de la subunidad 18S del ARNr y/o ADN mitocondrial (Ej. Genes de la citocromo oxidasa C).

En un esfuerzo para reducir la mortalidad y la morbilidad causada por la malaria el diagnóstico expedito y exacto, tratamiento rápido con antimaláricos efectivos, control de los mosquitos vectores (usando mosquiteros impregnados con insecticidas dentro y fuera de la vivienda), control químico y biológico de los criaderos de anofelinos, juegan un papel fundamental. En el mundo el apoyo político, técnico y financiero ha facilitado el incremento de las intervenciones en el control de la malaria, particularmente los cambios en la política con monoterapias poco efectivas de bajo costo, por ejemplo cloroquina, a las terapias basadas en la combinación de artemisina con otras drogas antimaláricas (ATCs), las cuales están recomendadas actualmente por la OMS. Estas son generalmente consideradas el mejor tratamiento para la malaria ocasionada por *P. falciparum*, ya que ésta presenta altas tasas de curación, además de una eliminación más rápida de los parásitos y por ende la capacidad de reducir la transmisión y la resistencia antimalárica (OMS, 2010; Barnes, 2012).

En cuanto a la malaria causada por *P. vivax*, suele ser tratada con cloroquina y primaquina. Sin embargo, los estadios asexuales son cada vez más resistentes a la cloroquina, aunque aún se mantienen sensibles a la artemisina, amodiaquina, mefloquina, piperaquina, lumefrantina y quinina las cuales son efectivas en el tratamiento de los merozoitos presentes en sangre. Los tratamientos con artemisina combinados con otros antimaláricos (ATCs) son el tratamiento de preferencia en áreas donde la malaria ocasionada por *P. falciparum* es endémica o donde *P. vivax* es resistente a la cloroquina. No obstante, estos no proveen una cura radical. La primaquina por otro lado, es la única droga curativa radical para *P. vivax*, la cual previene la recaída al eliminar los hipnozoitos presentes en el hígado (OMS, 2010; Barnes, 2012).

Las quinolinas como tratamiento para la malaria causada por P. vivax

Las 4-aminoquinolinas, cloroquina y amodiaquina, la quinolina metanol quinina y mefloquina, liberan toxicidad selectiva hacia los estadios eritrocíticos de los parásitos del género *Plasmodium*. Estas son dipróticas y menos solubles en lípidos a pH fisiológico, mientras que la quinolina metanol quinina y la mefloquina son bases mucho más débiles (Munghing y col., 1998).

La cloroquina, es una base débil diprótica sintética que pertenece a la familia de las 4-aminoquinolinas, que se ha mantenido como la principal terapia antimalárica, y solía ser la droga de elección para el tratamiento de la malaria causada tanto por *P. falciparum* como para *P. vivax*; aunque luego se descubriera que el primero es resistente a esta droga de manera que su terapéutica ha sido modificada. (Clark y col., 2012).

Mecanismo de acción de la cloroquina

Esta droga es altamente específica para la forma asexual de *Plasmodium*. Aunque aún no haya una explicación detallada de los mecanismos a través de los cuales ésta elimina los parásitos los siguientes procesos son esenciales para la acción letal del parásito. Después de atravesar las membranas eritrocítica y parasitofórica y plásmatica de *Plasmodium*, la cloroquina se concentra en la vacuola ácida digestiva del parásito principalmente a través de la captura de iones, lo que la convierte en cloroquina diprotonada, volviéndose no permeable para atravesar la membrana. Es en la vacuola digestiva donde el parásito digiere la hemoglobina del hospedador para obtener los aminoácidos esenciales. Sin embargo, este proceso libera grandes cantidades del grupo hemo soluble, el cual es tóxico para el parásito.

Por lo que para protegerse a sí mismo, polimeriza el grupo hemo a hemozoina, el cual se queda secuestrado en la vacuola digestiva del parásito.

La cloroquina se une específicamente al grupo hemo, previniendo su polimerización a hemozoina a través de la incorporación del complejo droga-hemo, en el polímero en crecimiento (Figs. 2, 3). Sin embargo, la interacción del complejo droga-hemo con la hemozoina es no covalente, ya que puede verse disminuida por lavados extensivos. Aun así es una interacción lo suficientemente fuerte para competir con la incorporación con el grupo hemo que se encuentra en concentraciones excesivas, el cual se une a la cadena en crecimiento a través de la formación de enlaces de hierro-carboxilato (Sullivan y col, 1996; Clark y col., 2012).

El incremento de pH y la acumulación del grupo hemo resulta en un daño oxidativo a las membranas, permitiendo la lisis de los parásitos y del eritrocito. La unión al grupo hemo y la prevención de su polimerización es un paso aparentemente crucial en la actividad antiplasmódica de las drogas, lo cual puede representar un mecanismo unificador para compuestos tales como la cloroquina, quinidina y mefloquina (Clark y col., 2012).

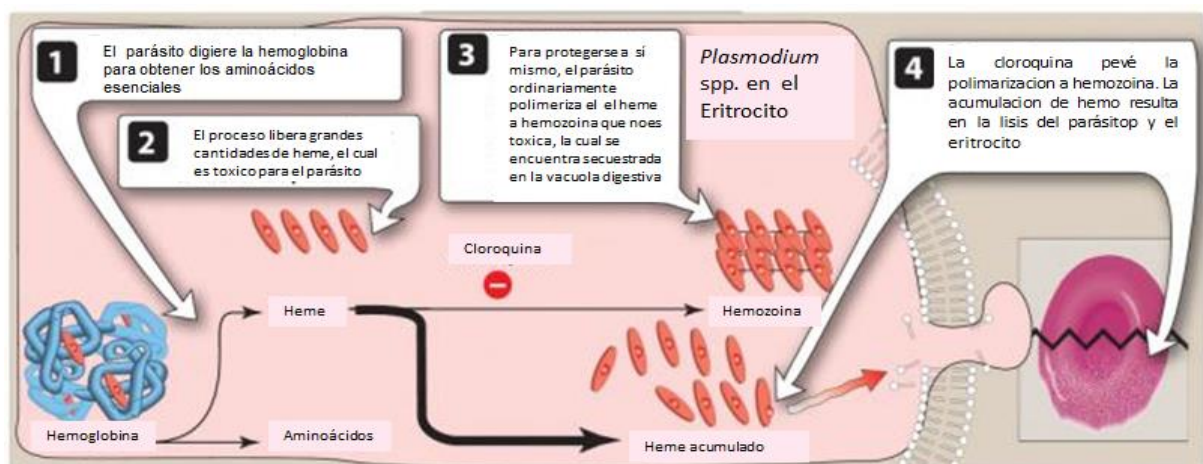


Fig. 2. Mecanismo de acción de la cloroquina (Clark y col., 2012)

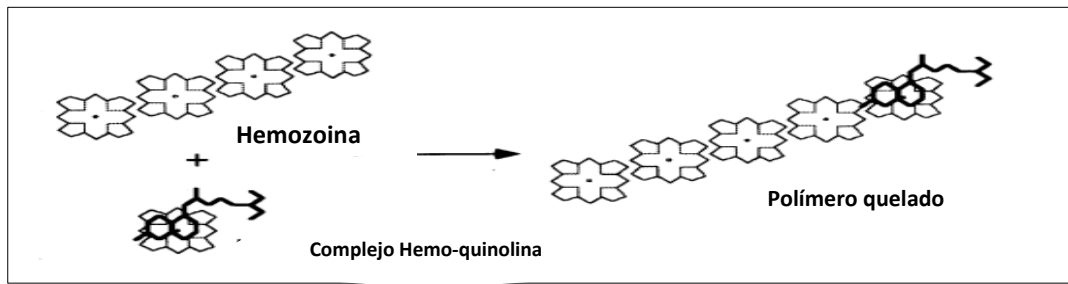


Fig. 3. Modelo de inhibición de la formación de hemozoina (Sullivan y col., 1996)

Resistencia a los antimaláricos

La resistencia se puede definir como la propiedad de los parásitos de una cepa o aislado para sobrevivir o multiplicarse a pesar de la administración y de la absorción de un medicamento en dosis iguales o superiores a las que se prescriben habitualmente, pero comprendidas dentro de los límites de tolerancia del enfermo (OMS, 2005).

Los aislados de una determinada especie de *Plasmodium*, pueden diferir en cuanto a la respuesta a un fármaco. Las fases evolutivas de un parásito también muestran diferencias en su sensibilidad a los mismos. Así, la eficacia de un medicamento como la primaquina, afecta a fases tan distintas morfológicamente, como el esquizonte exoeritrocítico de *P. vivax* y el gametocito de *P. falciparum*, esto indica que estas formas tiene procesos metabólicos similares al menos parcialmente. El hecho de que la primaquina no elimine la parasitemia asexual no implica la existencia de farmacoresistencia. Sin embargo, cuando un estadio del parásito normalmente sensible a su medicamento pierde esa sensibilidad y se presenta una resistencia, todos los otros estadios de ese parásito se vuelven resistentes al fármaco (Gabaldón y col., 1971).

La resistencia a los antimaláricos se expande de forma rápida en la mayoría de las áreas tropicales. Esta resulta de dos factores: 1) excepcional adaptabilidad del *Plasmodium* y 2) el uso indiscriminado de antimaláricos para profilaxis y tratamiento inadecuado de rutina de fiebres no diagnosticadas en áreas endémicas.

En este sentido la resistencia a la cloroquina involucra una gran complejidad genética, ya que se requiere de mutaciones múltiples, en los genes responsable de dicha resistencia (Knell, 1991).

Mecanismo de resistencia a los antimalaricos

La resistencia a la cloroquina está relacionada con una disminución de la concentración de la misma en el parásito resistente. Este hecho puede ser explicado a través de dos vías, que el parásito acumule menos droga o que se excrete rápidamente antes que ejerza su acción inhibitoria (Foote y col., 1994).

En la actualidad se ha avanzado mucho en el conocimiento de la resistencia a fármacos, fundamentalmente en *P. falciparum*. A nivel molecular se han descrito mutaciones en los genes que codifican para las enzimas dihidrofolato-reductasa (*Pfdhfr*) y de la dihidropteroato-sintetasa (*Pfdhps*) que confieren resistencia a la pirimetamina y a la sulfadoxina, respectivamente, y mutaciones en el gen codificante del transportador transmembrana de la vacuola digestiva *Pfcr1* que confieren resistencia a la cloroquina. Las mutaciones en un gen homólogo al de humanos *mdr1*, en las que se han identificado varios polimorfismos que se encuentran asociados con resistencia a drogas antimaláricas y con la eliminación del parásito, entre estos están los codones 86 (N86Y), 184 (Y184F), 1034 (S1034C), 1042 (N1042D), 1246 (D1246F); así mismo, la mutación del gen *Pfcr1* K76T confiere resistencia a cloroquina (Fidock y col., 2004; Mekonnen y col., 2014). Además en *P. falciparum* las mutaciones del gen *Pfdhfr* en posición 108 y del gen *Pfdhps* en posición 437 confieren resistencia a los antifolatos (Galindo y col., 2010). En este sentido, en *P. vivax* se ha encontrado que para el gen *Pvmdr1*, mutaciones en los codones 976 (Y976F) y 1076 (F1076L), pueden estar asociados a resistencia a la cloroquina (Mekonnen y col., 2014). Sin embargo, con la excepción de la resistencia a los fármacos antifolatos (sulfadoxina y pirimetamina), ampliamente estudiadas para *P. falciparum* y en las que se conoce que

mutaciones puntuales pueden estar asociados con resistencia; el mecanismo de acción y de resistencia a la mayoría de los fármacos actualmente en uso son desconocidos o están en discusión.

Chinappi y col. (2010) reportan que los parásitos de *P. falciparum* sensibles a cloroquina acumulan mucho más de la misma en la vacuola digestiva, que las cepas resistentes. La acumulación limitada de cloroquina observada en las vacuolas de los parásitos resistentes ha sido asociada con mutaciones puntuales en el gen codificante para la proteína transportadora de cloroquina (*Pfcr*t), localizada en la membrana de la vacuola digestiva y contiene diez dominios transmembrana. En el fenotipo de los aislados resistentes a cloroquina se ha encontrado la presencia de la mutación K76T para la pérdida de carga positiva en *Pfcr*t o en dos casos particulares K76N o K76I. Otra mutación, S163R, restaura la sensibilidad a cloroquina en los parásitos. La mutación K76T puede que permita la interacción del *Pfcr*t con la cloroquina cargada positivamente (CQ^+ o CQ^{++}) y facilita su salida de la vacuola, con el resultado neto del descenso de la concentración de la droga dentro de la vacuola digestiva.

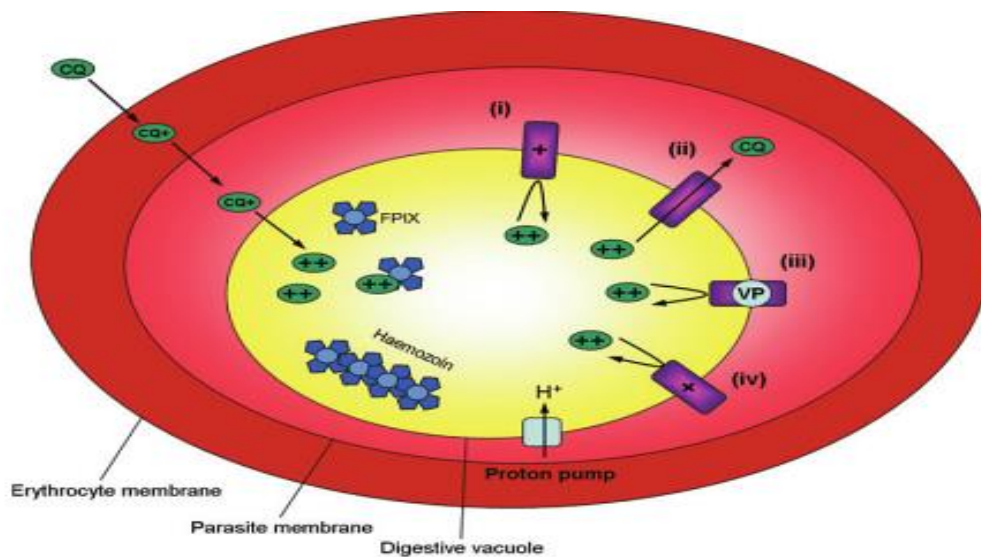


Fig. 4 Mecanismo de Eflujo de la Droga en *P. falciparum*. (i) En el fenotipo silvestre la carga positiva del residuo de Lisina previene el movimiento de la cloroquina diprotonada (CQ^{++}) a través de *Pfcr*t (ii) El reemplazo de este residuo en los parásitos resistentes a CQ por la mutación K76T permite el flujo de la CQ^{++} a través del *Pfcr*t (iii) Verapamil VP puede actuar reintroduciendo una carga positiva a la barrera de la proteína *Pfcr*t resultando en un incremento de la sensibilidad a cloroquina (iv) la selección de una nueva mutación potencialmente disminuye los efectos del VP y del residuo de lisina del codón 76 introduciendo una carga al *Pfcr*t, sin embargo este previene el flujo de cloroquina a través del *Pfcr*t (Mayers, 2009).

En cuanto a *P. vivax*, el primer caso de resistencia a cloroquina se detectó en 1989 en Papúa Nueva Guinea, y luego se detectaron casos en Pacífico Occidental (Indonesia, Filipinas), Sudeste Asiático (Unión de Myanmar – Birmania, India, Vietnam), Sudamérica (Colombia y Guyana), y Oriente Medio (Turquía). Actualmente, la resistencia de *P. vivax* está muy extendida y se ha descrito para cloroquina y para la asociación sulfadoxina-pirimetamina (fansidar) (Antunes y col., 2014).

Sin embargo, los mecanismos de la resistencia a cloroquina en *P. vivax* no están completamente dilucidados y pueden implicar a varios *loci* genéticos, aunque dos genes, *Pvcrt* y *Pvmdr1*, homólogos a los encontrados en *P. falciparum*, se han identificado como posibles marcadores de la resistencia de *P. vivax* a cloroquina. No obstante, no se han definido los polimorfismos de estos genes que se correlacionen con la resistencia a este fármaco, cuando se han realizado estudios comparando las concentraciones inhibitorias *in vitro* con los polimorfismos que poseen tales cepas (Sá y col., 2005). Otros autores han publicado que el polimorfismo Y976F del gen *Pvmdr1* podría proporcionar un apoyo para correlacionarse con la resistencia a cloroquina, por estar asociado con mayores concentraciones inhibitorias en los estudios de quimio sensibilidad *in vitro*. (Suwanarusk y col., 2007; Barnadas y col., 2008).

Algunos investigadores han implementado la técnica de PCR alelo-específica, a través del Sistema de amplificación de la mutación refractaria (ARMS) como estrategia para detectar estos polimorfismos. Esta técnica se fundamenta, en la observación de que la amplificación es ineficiente o completamente refractaria si existe un desajuste entre el extremo 3' de un cebador para PCR y el amplificado correspondiente. La *Taq* polimerasa carece de actividad exonucleasa 3' \rightarrow 5', y por ende no puede corregir los errores del terminal 3' del cebador. Tal que, el apareamiento de bases complementaria en el extremo 3' del cebador es requerido para la amplificación eficiente por la *Taq* polimerasa y es un factor

fuertemente determinante de la especificidad del templado. La amplificación del alelo silvestre, y no la del mutante es realizada utilizando un iniciador que es complementario al alelo silvestre y que presenta un desajuste entre el residuo 3' y el alelo mutante. Contrariamente, el mutante solo se amplificará si el residuo 3' del iniciador es complementario al alelo mutante y no al silvestre (Patrinos y col., 2010).

La amplificación del gen *Pvmdr1* y los polimorfismos en algunos nucleótidos se correlacionan con la sensibilidad de *P. vivax* a varios fármacos antimaláricos. La cloroquina y la mefloquina parece que ejercen una presión selectiva en la evolución del gen *Pvmdr1*, igual que ocurre con el gen *Pfmdr1* de *P. falciparum* (Barnadas y col., 2008).

Características del gen *Pvmdr1*

La comparación de los genes *Pfmdr1* y *Pvmdr1* hecha por Brega y col. (2005) muestra que el gen *Pvmdr1* presenta un único marco abierto de lectura de 4392 pb que codifica a una proteína de 1464 aminoácidos. La metionina iniciadora de la traducción está localizada en la posición 1 y presenta una región codificante continua que se detiene en el codón 1464. En este el contenido de guanina y citosina es del 42%, una figura típica de la secuencias codificantes de *P. vivax*.

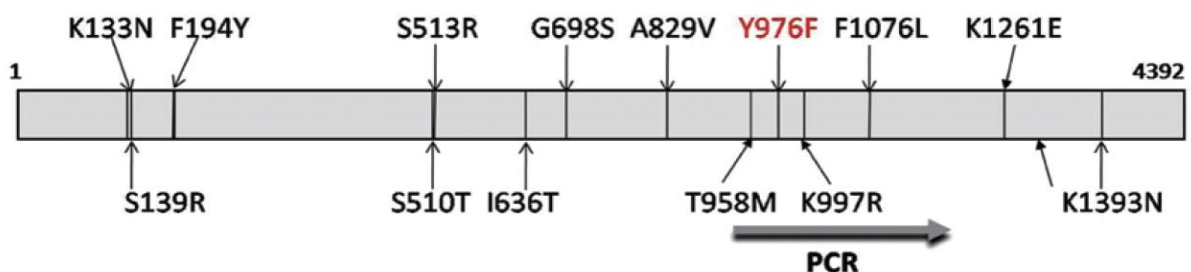


Fig. 5 Diagrama esquemático de las posiciones de las mutaciones puntuales de aminoácidos y las regiones de secuenciación del gen *Pvmdr1*. Las mutaciones puntuales previamente reportadas son indicadas y aquellas que confieren resistencia están marcadas en rojo (Feng y col., 2012).

Al ser secuenciado, fragmentos del gen obtenidos mediante su amplificación por PCR, se encontró que un primer fragmento, que abarcaba los codones desde la posición 91 a la 189 (Las cuales son homologas a los sitios polimórficos 86 y 184 en *P. falciparum*, respectivamente), mostró la ausencia de mutaciones no sinónimas. En el segundo fragmento que abarcaba codones desde la posición 1071 y 1079, se encontraron dos mutaciones no sinónimas, en las posiciones 976 y 1076 (Brega y col., 2005). Sin embargo, se han encontrado otras mutaciones homólogas entre ambos genes como las que se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Mutaciones en el gen *Pvmdr1* de *P. vivax* y sus posiciones homologas en *P. falciparum*.

Posición polimórfica en <i>P. vivax</i>	Silvestre	Mutante	Posición homologa en <i>P. falciparum</i>
91	N (Asn)	Y(Tyr)	86
189	Y (Tyr)	F (Phe)	184
1071	S (Ser)	C (Cys)	1034
1079	N (Asn)	D (Asp)	1042
1291	D (Asp)	F (Phe)	1246
133	K (Lys)	N (Asn)	128
139	S (Ser)	R (Arg)	134
976	Y (Tyr)	F (Phe)	940
1076	F (Phe)	L (Leu)	1039
1261	K (Lys)	E (Glu)	1216

Brega y col., 2005; Imwong y col., 2008; Orjuela-Sánchez y col., 2009

El análisis de las secuencias completas del gen *Pvmdr1* demostró que en él están contenidos 24 SNPs y una sola secuencia micro-satélite conservada. Notablemente, 17 de los 24 SNPs detectados fueron no sinónimos; 11 estaban contenidas en los bucles extracelulares predichos en la vacuola digestiva del parásito, y 5 estuvieron presentes en los dominios

transmembrana. A pesar de la alta frecuencia de SNPs, ninguno se encontró en los motivos ABC conservados (Orjuela-Sánchez y col., 2009).

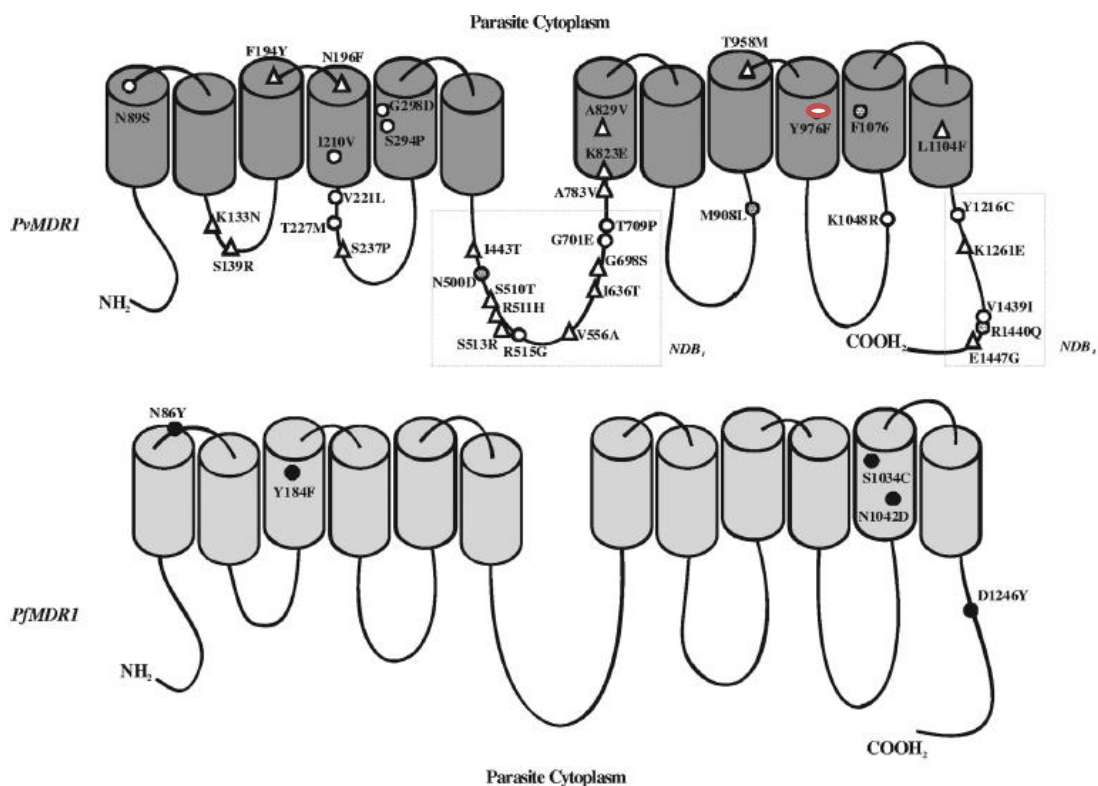


Fig. 6. Modelo de la estructura proteica y polimorfismos representativos expresados por el gen *Pvmdr1* y *Pfmldr1*. *Pfmldr1* presenta dos dominios hidrofóbicos análogos, cada uno con seis α -hélice y un dominio citosólico que alberga al Dominio 1 de Unión al Nucleótido (NBD₁) y NBD₂ cada uno contiene un sitio de unión a ATP con motivos Walker característicos A y B y la firma S (cassette dependiente de ATP) de estos transportadores. En esta figura, los cuadros con líneas punteadas en el diagrama de *Pvmdr1* delimita la localización de los NBD predichos. En la ilustración de *Pfmldr1*, los puntos cerrados representan las mutaciones puntuales asociadas con la resistencia a cloroquina en *P. falciparum*. En la imagen del *Pvmdr1*, los puntos abiertos representan los SNPs descritos previamente, los triángulos abiertos SNPs identificados en el estudio de Orjuela-Sánchez (2009) y los puntos con relleno representan los SNPs encontrados por otros investigadores. En este particular el punto rojo representa el polimorfismo Y976F (Orjuela-Sánchez y col., 2009).

Hasta el momento, la función del transportador *mdr-1* en *P. vivax* no ha sido estudiada ampliamente; sin embargo, su homólogo en *P. falciparum* (*Pfmldr1*) y su función han sido evaluados por algunos investigadores.

El transportador *Pfmdr1* comparte varias características con los transportadores ABC que se sobre expresan en células cancerígenas y que suelen incrementar la resistencia a drogas al ser capaz de expulsar activamente un amplio rango de agentes quimioterapéuticos que son estructural y funcionalmente distintos; por lo que se ha propuesto que este puede ser la principal molécula para conferir resistencia a la cloroquina en *P. falciparum* (Foote y col. 1989; Sánchez y col., 2010).

La función fisiológica del *Pfmdr1* es desconocida y solo se pueden extrapolar los hallazgos del transportador homólogo *mdr-1* que se encuentra en mamíferos y plantas, los cuales son capaces de transportar iones, lípidos y glucósidos. Cualquiera que sea su función realmente, esta parece ser esencial, puesto que el gen no puede ser bloqueado (Sánchez y col., 2010).

El propio transportador puede ser un blanco de las drogas antimaláricas, incluyendo quinina y mefloquina, como se ha demostrado en estudios de competitividad, lo cual sugiere que algunas de las drogas con las que el *Pfmdr1* interactúa pueden funcionar como sustrato e inhibidor. Un hallazgo que ha sido reportado en la P-glicoproteína en humanos. Un modelo plausible para el transportador es que la quinina y posiblemente otros antimaláricos ocupan un sitio de unión común, mientras inhiben el transporte de otros solutos (Sánchez y col., 2010). Esto posiblemente conlleva a un alto costo en el “fitness” del parásito, puesto que la presencia de estas mutaciones altera la función y estructura de proteínas clave que tiene como finalidad evadir la acción de compuestos nocivos que pueden también comprometer el normal funcionamiento de las mismas. Por lo que, mutaciones compensatorias pudieran ayudar a los parásitos que presentan la mutación a superar la pérdida de capacidad funcional que se propone (Hayward y col., 2005; Sánchez y col., 2010).

La realización de estudios terapéuticos que evalúen la eficacia (protocolos *in vivo*) de los medicamentos antimaláricos se ha vuelto costosa, lenta y muy difícil. Si bien los estudios terapéuticos son fundamentales para orientar los cambios de las políticas de los esquemas terapéuticos, los estudios de quimiosensibilidad (protocolos *in vitro*) de *P. vivax* también se hacen complicados debido a la dificultad de esta especie para ser mantenida en cultivos continuos, por lo que la vigilancia molecular representaría una estrategia complementaria importante en la predicción de las modificaciones en la sensibilidad a los medicamentos antimaláricos y en consecuencia cuándo cambiar los esquemas terapéuticos por el programa de control de la malaria.

Por lo antes expuesto, se propone iniciar la búsqueda de algunos marcadores genéticos validados asociados con farmacorresistencia.

ANTECEDENTES

Plasmodium vivax es la especie más ampliamente distribuida, se estima que causa cerca de 390 millones de casos clínicos cada año en América Latina, el medio este, central, sur y sureste de Asia, Oceanía y el este de África (Barnadas y col., 2008; Antunes y col., 2014; Price y col., 2014); países en los cuales existen actualmente más de 2.93 billones de personas en riesgo de infección. Cerca de un millón y medio de infecciones de malaria confirmadas (80% debido a *P. vivax*) son anualmente reportados en 21 países endémicos a lo largo de América (Antunes y col., 2014).

La malaria originada por *P. vivax* es una causa importante de morbilidad, especialmente en niños, con consecuencias adversas para la educación, desarrollo y el

bienestar. A diferencia de la malaria causada por *P. falciparum*, los estadios latentes (hipnozoitos) de *P. vivax*, en el hígado causan la recaída de los pacientes, después de semanas o meses del ataque inicial tratado (Price y col., 2014). En algunas áreas, las infecciones recurrentes pueden surgir tan pronto como cada tres semanas, con las recaídas la principal causa de la enfermedad por *P. vivax* viene dada por episodios febriles agudos, los cuales además están asociados con anemia, retardo del crecimiento intrauterino, aborto y una enfermedad severa y fatal (Marfurt y col., 2008; Price y col., 2014).

El descubrimiento en 1940 de una droga sintética denominada cloroquina (CQ); la cual permitía un tratamiento seguro y poco costoso de los individuos, conllevó a que a principios de 1950, se convirtiera en la mejor droga antimalárica para todas las especies de *Plasmodium*, una década después surgió resistencia a la misma (Maberti, 1960; Soto y col., 2001; Klein, 2013; Price y col., 2014). La resistencia de *P. falciparum* a la cloroquina se distribuyó a lo largo de los países endémicos causando la muerte a millones de personas (Price y col., 2014).

La cloroquina al ser usada en conjunto con primaquina, resulta en una combinación altamente efectiva en el tratamiento de la malaria por *P. vivax*, ya que esta combinación controla la fase aguda de la enfermedad y al mismo tiempo previene la recaída causada por la presencia de estadios latentes en el hígado (hipnozoitos) (Price y col., 2014).

Sin embargo, Rieckmann (1989) reporta el primer caso de resistencia a cloroquina de *P. vivax*, la cual fue demostrada a través de un estudio *in vivo* con dos pacientes que retornaban de Papúa Nueva Guinea a Australia; en el cual se encontró una respuesta inadecuada al tratamiento con cloroquina, debido a que las dosis administradas de 300 mg/base de cloroquina, 12,5 mg de pirimetamina y 100 mg de dapsona, no surtieron efecto

sobre la infección de manera que los pacientes seguían presentando sintomatología aun cuando esta dosis está por encima de los 15 ng/mL de plasma terapéuticamente efectivos (recomendados) contra *P. vivax*; esto sugería entonces que los parásitos de *P. vivax* que infectaban a los pacientes tenían un nivel muy alto de reducción en su susceptibilidad a esta droga.

En Irian Jaya, Indonesia para 1991 se desarrolló una investigación con estudios *in vivo* de resistencia de *P. vivax* a cloroquina, en el cual se tomaron dieciséis paciente a los cuales se les suministraba la droga (5 mg base/Kg-p) por un período de vigilancia de ocho semanas; estos presentaban, estadios latentes en el hígado. Un americano que trabajaba en la misma villa en donde fue realizado el estudio desarrolló parasitemia sintomática a pesar de estar tomando cloroquina. Cinco días después de terapia con 600 mg de cloroquina, la parasitemia asexual incrementó 40 veces, la cual desapareció luego del tratamiento con 1.500 mg de cloroquina. Incluso cuando no se tenían muestras de suero de todos los pacientes, en seis de ellos y en el suero del americano, se observaron niveles excesivos de cloroquina que superaban a los niveles supresores de la droga (15 ng/mL) durante el período que presentaban parasitemia con estadios asexuales. De manera que la tableta base de 300 mg de cloroquina, que representa la profilaxis estándar que había contrarrestado la malaria por más de cuarenta años, no fue efectivo para infecciones por *P. vivax* en Irian Jaya (Baird y col., 1991).

Dua y col. (1995) realizaron un estudio en la Indian Oil Corporation (IOC), Mathura localizada al oeste de Uttar Pradesh, al Norte de la India. Todos los casos provenientes de esta comunidad fueron diagnosticados en el Centro de Investigación de Malaria (MRC) y a los casos positivos se les administró tratamiento radical de acuerdo con la política nacional de drogas: 600 mg de cloroquina y 15 mg de primaquina durante cinco días para tratar los casos de malaria causada por *P. vivax*. En este particular, las concentraciones administradas de

cloroquina eran altas en comparación con la terapéuticamente efectiva en el hombre (15 µg/L); encontraron recrudescencia de la parasitemia, a pesar de las altas concentraciones del medicamento, confirmando así la resistencia de *P. vivax* a dosis estándar de cloroquina.

La resistencia a cloroquina se ha extendido a lo largo del mundo, siendo reportada en La Unión de Myanmar, Malasia, Tailandia, Vietnam, Filipinas, Centro y Sur América (Baird, 2004; Lu y col., 2011).

Los primeros reportes de resistencia a cloroquina en la malaria por *P. vivax* en Latinoamérica fueron de Colombia y Brasil, sin embargo el tratamiento antimalárico en estos estudios no fue supervisado y los niveles del medicamento en sangre no fueron medidos. Consecuentemente, no fue sino hasta 1996 que la resistencia a cloroquina fue formalmente documentada en una cepa de *P. vivax* de esta región. Phillips y col. (1996) reportaron los casos de tres pacientes que adquirieron una infección por *P. vivax* en Guyana, a quienes les falló la terapia estándar con cloroquina (25 mg/Kg-p). Posteriormente, se observó una recrudescencia de la infección en dos de los pacientes durante el seguimiento del tratamiento y su observación, la cual fue tratada con una combinación de cloroquina (25 mg/Kg-p) más una alta dosis de primaquina (2,5 mg/Kg-p por 48 horas), lo que para el momento había resultado efectivo en otras regiones del mundo. Sin embargo, en ambos se observó recrudescencia luego de haber recibido tratamiento seis u ocho semanas atrás, por lo cual concluyeron la presencia de *P. vivax* resistente a cloroquina (Phillips y col., 1996).

En 2001, un nuevo reporte de *P. vivax* resistente a cloroquina originario de Colombia, fue realizado por el grupo de Soto y col. (2001), quienes llevaron a cabo un estudio prospectivo con 28 días de seguimiento de la respuesta clínica a cloroquina en dos regiones endémicas para malaria por *P. vivax*. Tres de 27 pacientes presentaron falla terapéutica al

tratamiento con el régimen estándar de cloroquina (1.500 mg base por tres días). Un paciente presentó resistencia **RI** en el día 26; otro paciente mostró **RI** debido a la recrudescencia de los estadios en sangre para el día 11; otro paciente mostró resistencia **RII** porque nunca desapareció la parasitemia en sangre periférica. Todos los pacientes fueron exitosamente tratados con primaquina, sobre todo cuando se combinó con un segundo curso de cloroquina. En conclusión reportan que la resistencia clínica de *P. vivax* a cloroquina está presente en Colombia.

En Perú, se evaluó la posible presencia de resistencia a cloroquina para lo cual se condujo un estudio de eficacia de la droga durante 28 días en tres lugares de la región Amazónica y en una costa noreste del Pacífico. Se trataron a un total de 242 pacientes de edades comprendidas entre 2 y 60 años (177 de la región Amazónica y 65 de la región costera). Todos los sujetos recibieron terapia directa y supervisada con cloroquina, 25 mg/Kg-p durante tres días. El 49% de los pacientes había manifestado fiebre y 96% tenía historia de fiebre; la media geométrica de la densidad de parásitos fue de 5.129 parásitos/ μ L. Un total de 212 (88%) de los sujetos completaron su seguimiento de 28 días. Cuatro de 177 pacientes de la región amazónica tuvo una recrudescencia de la parasitemia de *P. vivax* en los días 21 y 28 después de que el tratamiento fue iniciado. Dos de esos pacientes tenían infecciones resistentes a la cloroquina, basándose en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la genotipificación del polimorfismo conformacional de apareamiento único. Ninguno de los pacientes de la Costa Noreste del Pacífico presentó parasitemia recurrente (Ruebush II y col., 2003).

El surgimiento de casos de resistencia de *P. vivax* a los antimaláricos, ha generado una gran preocupación a nivel mundial, puesto que la cloroquina continúa siendo el tratamiento aplicado para contrarrestar la malaria ocasionada por esta especie, por lo que ha surgido la

necesidad de realizar estudios *in vivo*, *in vitro* y moleculares, que asocien la susceptibilidad del parásito al medicamento y su relación con genes codificantes que puedan conferir esta resistencia.

En Manaus, desde septiembre de 2004 a febrero de 2005, se condujo un estudio *in vivo* en la Fundación para Medicina Tropical de Amazonas (FMTAM), para ensayar la terapia estándar de cloroquina supervisada. El protocolo incluyó 166 voluntarios con malaria causada *P. vivax* sin complicaciones. A cada sujeto se le administraron tabletas de cloroquina de 150 mg (10+7,5+7,5 mg/Kg-p a intervalos de 24 horas). La primaquina fue retenida hasta el día 28 (régimen de dosis: 30 mg/ día por 7 días). Entre los 109 voluntarios que completaron el estudio *in vivo*, 19 presentaron extendidos positivo a los 28 días del seguimiento. Todos necesitaron otra alternativa terapéutica (mefloquina). La adecuada absorción de cloroquina fue confirmada en estos casos al día 2 con una media \pm SD de la concentración en plasma igual a 785,4 \pm 800,1 ng/mL. La sospecha de falla terapéutica (*P. vivax* resistente a CQ), fue confirmada en 11 de las 109 personas con una concentración media de cloroquina en plasma \geq 10 ng/mL (356,6 \pm 296,1 ng/mL). Este estudio de eficacia demostró que el 4,4% de los sujetos presentaban *P. vivax* resistente a cloroquina (de Santana Filho y col., 2007).

Un segundo estudio *in vivo* hacia el oeste de la región Amazónica, estimó la resistencia a cloroquina en pacientes con malaria por *P. vivax* sin complicaciones, con el uso de cloroquina y primaquina simultáneamente. De un total de 135 sujetos que se comprometieron a tener un seguimiento durante 28 días, la falla terapéutica se observó en 7 pacientes, en quienes la concentración de cloroquina y desetilcloroquina en plasma fue de 100 ng/dL. El análisis univariado mostró que la exposición previa a la malaria y la alta parasitemia guardan relación. En el día tres los niveles de CQ/DCQ fueron menores en

pacientes que presentaban parásitos resistentes (1.069,8 ng/mL) que en los pacientes que presentaron los parásitos susceptibles (3.311,1 ng/mL), incluso cuando la concentración en plasma de la droga era diez veces mayor a los niveles efectivos, en el primer grupo; en los siguientes días del seguimiento no se observó diferencia significativa en estas concentraciones (Marques y col., 2013).

Luego de que se demostró la presencia de focos aislados de *P. vivax* resistente a cloroquina se ha tratado de encontrar en este parásito polimorfismos genéticos que nos permitan correlacionar dicha resistencia con mutaciones puntuales. Para ello, Brega y col. (2005) identificaron el ortólogo del gen *Pfmdr1*; en *P. vivax*, el *Pvmdr1* ha mostrado tener un papel en la resistencia a drogas en *P. falciparum*. La comparación entre el alineamiento de la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos con otras de los genes de multiresistencia a drogas en *Plasmodium* spp. reveló un marco abierto de lectura de 4392 pb codificantes de una proteína de 1464 aminoácidos. Los polimorfismos nucleotídicos en dos codones del gen *Pvmdr1* (Y976F y F1076L) fueron encontrados en 14 de 23 aislados de *P. vivax* de diferentes áreas endémicas, incluyendo Tailandia, Indonesia, Turquía, Azerbaijón, y la Guyana Francesa.

En un intento por asociar los genes *pvdhfr* y *pvmrd1* a la resistencia hacia otras drogas antimaláricas, se realizó un ensayo con la finalidad de buscar marcadores moleculares de resistencia para amodiaquina y la combinación de sulfadoxina-pirimetamina, en el cual se evaluó la presencia de mutaciones en los genes *pvdhfr* y *pvmrd1* en 94 pacientes que recibieron amodiaquina más sulfadoxina-pirimetamina en Papúa Nueva Guinea. Con lo que se investigó la asociación entre el genotipo del parásito y la respuesta al tratamiento. Se encontró que la tasa de falla terapéutica había incrementado al 13%. Los polimorfismos en los genes *pvdhfr* F57L, S58R, T61M y 117T/N y *Pvmdr1* Y976F fueron detectados en un

60%, 67%, 20%, 40% y 39% de las muestras respectivamente. El único mutante *pvdhfr* 57 mostró la asociación más fuerte con la falla terapéutica. La presencia combinada del cuádruple mutante *pvdhfr* 57L+58R+61M+117T y la mutación 976F de *Pvmdr1* fue el mejor vaticinador de la falla terapéutica. Esto permitió que se llegara a la conclusión de que el marcador molecular presente en *Pvmdr1* está asociado a la respuesta *in vivo* a AQ+SP (Marfurt y col., 2008).

En ese mismo año otro grupo de investigadores publica un estudio de la eficacia terapéutica de la cloroquina en la malaria causada por *P. vivax* y la prevalencia de mutaciones en los genes *Pvcrt-o* y *Pvmdr1* antes del tratamiento, y la asociación entre los parásitos mutantes y la respuesta clínica de los pacientes al tratamiento con cloroquina. Los aislados clínicos fueron colectados en seis sitios “centinelas” localizados en tres estratos epidemiológicos para la malaria a lo largo de Madagascar en 2006. Los pacientes fueron encuestados, tratados y seguidos de acuerdo con las normas establecidas por la Organización Mundial de la Salud en 2001 para infecciones por *P. vivax*. La secuenciación fue utilizada para analizar los polimorfismos de los genes *Pvcrt-o* (exones 1-6) y *Pvmdr1*. La tasa de falla terapéutica, luego del ajuste para la genotipificación fue estimada al 5,1% para los 105 pacientes incluidos, que van de cero en el Sur a 14,8% en los pie de montaña de las Tierras Altas Centrales. Todas las muestras fueron silvestres para *Pvcrt-o* pero mutantes para el gen *Pvmdr1*. Diez mutaciones no homólogas fueron encontradas en el gen *Pvmdr1*, incluyendo cinco nuevas mutaciones, cuatro de las cuales estuvieron presentes a bajas frecuencias (1,3% a 7,5%) mientras que la mutación S513R estuvo presente a una alta frecuencia (96,3%). Las otras cinco mutaciones, incluyendo Y976F, descritas anteriormente presentaron frecuencias que van de 97,8% a 100%. Sus descubrimientos en este caso sugieren que los aislados de *P. vivax* resistente a cloroquina están presentes en Madagascar. La mutación Y976F resulta una herramienta útil en el monitoreo de la resistencia a cloroquina (Barnadas y col., 2008).

Barnadas y col. (2011) desarrollaron otro método de detección de la resistencia a drogas asociada a mutaciones en los genes *dhfr*, *dhps* y *mdr1* en *P. vivax*. Para ello los fragmentos de cada gen fueron amplificados a través de una PCR anidada multiplex. Luego, los productos de la PCR fueron procesados a través de LDR-FMA (reacción de detección de ligasa- ensayo de microesferas fluorescentes) 23 SNPs, incluyendo *Pvdhfr* 57-58-61 y 173, *Pvdhps* 382-383, 553, 647 y *Pvmdr1* 976, fueron simultáneamente evaluados en 366 aislados de Papúa Nueva Guinea. En este caso la genotipificación fue exitosa en 95,4% de las muestras para al menos un gen. Por otro lado, el 73,1% de los pacientes fue infectados con al menos un genotipo silvestre en los codones 57,58 y 61 de *Pvdhfr*, un mutante triple fue detectado en el 65,5% de los pacientes, a menudo asociado con la mutación 117T. Solo un paciente presentó la mutación 173L. El genotipo mutante 647 *Pvdhps* representó un avance de la fijación de los genes (99,3%), mientras que el 35,1% de los pacientes presentaron el alelo mutante 976F. De esta manera, en este artículo los autores describen una nueva técnica de genotipificación de los alelos de resistencia en los genes anteriormente mencionados (Barnadas y col., 2011).

Khattack y col. (2013) detectaron la prevalencia y presencia de marcadores de resistencia a antifolatos y cloroquina en Pakistán. Con esta finalidad 801 muestras microscópicamente confirmadas para malaria colectadas en 14 lugares que representan cuatro provincias y la ciudad capital de Islamabad. La PCR especie específica fue utilizada para identificar la infección por especies de *Plasmodium*. Los aislados positivos en PCR para *P. vivax* se utilizaron para la secuenciación de los genes *Pvdhfr*, *Pvhps* y *Pvmdr1* y para su análisis mediante PCR en tiempo real para ensayar el número de copias. De las 801 muestras, 536 se determinó que era *P. vivax* positivo, 128 presentaron *P. falciparum*, 43 fueron infecciones mixtas *P. vivax*/*P. falciparum* y 94 resultaron negativas. De las muestras

positivas para *P. vivax*, 372 fueron utilizadas para el análisis de las secuencias. Setenta y seis de los aislados resultaron doble mutante en las posiciones S58 y 117 en *Pvdhfr*. Adicionalmente, dos mutaciones en las posiciones N50I y S93H fueron observados en 55 y 24 de las muestras respectivamente. Tres inserciones-delecciones de 18 pares de bases se observaron en *Pvdhfr*, con dos inserciones en diferentes posiciones en 36 aislados y delecciones en 10. Noventa y dos por ciento de la muestras contenían (S382/A383G/K512/A553/V585) el haplotipo silvestre SAKAV. Para *Pvmdr1*, todos los aislados fueron silvestres en la posición Y976F y 335 llevaban la mutación F1076L. Todos los aislados presentaron copias únicas de este gen. Esto último les permitió concluir que la eficacia de la combinación de cloroquina más pirimetamina debido a la prevalencia del mutante *Pvmdr1*, específicamente el codón F1076L podría estar comprometida.

Posteriormente, un estudio en Manaus, Brasil acerca de los niveles de expresión de los genes que presuntamente confieren resistencia a cloroquina, se trabajó con dos grupos de pacientes: 1) pacientes a quienes se les había caracterizado clínicamente la resistencia a la cloroquina 2) pacientes con malaria por *P. vivax* severa comparados con pacientes que no presentaron ninguna severidad. La PCR en tiempo real (cuantitativa) fue llevada a cabo para comparar los dos transportadores genéticos principales en *P. vivax*: transportador de resistencia cloroquina (*Pvcrt-o*) y el transportador de multiresistencia a drogas (*Pvmdr1*). Doce casos resistentes a cloroquina y otros quince aislados de casos susceptibles fueron incluidos en el primer grupo de pacientes. Para el segundo grupo, siete pacientes con infección severa y diez pacientes con infección leve fueron incluidos. Los parásitos de pacientes con resistencia a cloroquina presentaron un rango de 6,1 (95% C.I.= 3,8- 4,3) y 2,4 (95% C.I.: 0,53-9,1) de incremento en la presencia de *Pvcrt-o* y *Pvmdr1* respectivamente comparado con el grupo susceptible. Los parásitos del grupo con infección severa mostraron un rango de 2,9 (95% C.I.= 1,1- 8,3) y 4,9 (95% C.I.= 2,3- 18,8) de incremento en los niveles

de expresión de *Pvcrt-o* y *Pvmdr1* comparado con el grupo control con infección leve. Estos descubrimientos sugieren que la resistencia a cloroquina y la severidad clínica en infecciones por *P. vivax* están fuertemente relacionados con los niveles de expresión de los genes *Pvcrt-o* y *Pvmdr1* aparentemente involucrados en la resistencia a cloroquina (Melo, 2014).

En lo que se refiere a estudios *in vitro* de quimiosusceptibilidad a drogas con *P. vivax*, existe la dificultad de mantener esta especie en cultivos continuos ya que requieren glóbulos rojos jóvenes, por lo que los cultivos tienden a ser muy cortos al contrario de lo que ocurre con *P. falciparum*. A pesar de ello se han desarrollado algunas investigaciones en este ámbito, en conjunto con estudios *in vivo* e investigación de marcadores a nivel molecular.

Suwanarusk y col. (2007) utilizaron un método de maduración de esquizontes modificado, investigaron el perfil de susceptibilidad de la cloroquina *in vitro*. En este método se redujo el hematocrito final de la mezcla media de sangre (BMM) de 4% a 2%, del cual se utilizaron 50 μ L por cada placa. La BMM fue agregada a placas previamente sensibilizadas con diluciones de cloroquina a concentraciones que desde 2992 nM a 2,92 nM. Además se detectaron los marcadores moleculares, presentes en los aislados de Papúa, Indonesia, en donde altos niveles de falla terapéutica han sido reportados y de Tailandia, en donde el tratamiento es generalmente efectivo. En este estudio la media geométrica del IC₅₀ de la cloroquina para aislados de *P. vivax* de Papúa (n= 145) fue de 312 nM [95% CI: 237-411 nM] comparado con 46,8 nM [95% CI: 34,7-63,1 nM] de Tailandia (n= 81). Varios polimorfismos fueron detectados en la secuencia de los genes *Pvcrt-o* y *Pvmdr1*, e incluso se detectó diferencia en el número de copias que se encontraba en *Pvmdr1* con respecto a *Pvcrt-o*. La mutación Y976F fue detectada en *Pvmdr1*, la cual estaba presente en 96% de los aislados de Papúa y en el 25% de los aislados provenientes de Tailandia. En cuanto a la media geométrica del IC₅₀ de la cloroquina en los aislados con la mutación Y976F fue de

283 nM comparada con 44,5 nM que se encontró en los aislados con el tipo silvestre del gen. La amplificación de *Pvmdr1* se encontró en 23% de los aislados de Tailandia comparado con ninguna amplificación en los aislados provenientes de Indonesia, sin embargo no fue asociada con el incremento de la resistencia a cloroquina. Estos resultados demuestran que la prueba de susceptibilidad discrimina entre poblaciones con diferentes niveles de eficacia clínica a la cloroquina. El polimorfismo Y976F en *Pvmdr1* puede aportar una herramienta muy útil para áreas con surgimiento de resistencia a cloroquina (Suwanarusk, 2007).

Lu y col. (2011) determinaron la susceptibilidad de los aislados proveniente de la República de Corea en presencia de las drogas antimaláricas. Para ello, se prepararon diluciones para drogas como: la cloroquina, mefloquina, quinina, cloroquina difosfato, DDQ, artesunato, con las cuales fueron sensibilizadas las placas, la incubación fue detenida cuando los parásitos presentes estaban maduros o al menos hasta que un 40% de los mismos estuviesen maduros. Estos posteriormente fueron medidos a través de métodos microscópicos, encontrándose que la susceptibilidad de los aislados coreanos a los antimaláricos fueron de 83,9% (cloroquina), 80,8% (mefloquina y quinina) y 76,9% (artesunato). La media geométrica del IC₅₀ de los 24 aislados fue confirmada a través de métodos microscópicos y un ensayo de ELISA pLDH y el IC₅₀ fue de 58,2nM para el 87,5% de los aislados y llegaron a la conclusión de que no existen altos niveles de resistencia en la República de Corea.

Chehuan y col. (2013) evaluaron 112 aislados de *P. vivax*, los cuales fueron probados para susceptibilidad *in vitro* a cloroquina y aparte 47 de ellos fueron ensayados para mefloquina. El ensayo de inmunoabsorbancia de unión a una enzima para la captura del antígeno lactato deshidrogenasa (DELI), fue usado para detectar el crecimiento de *P. vivax* en el cultivo rápido de 48 horas en los aislados con estadíos en forma de anillo que van de 50 a

70%. Cada aislado fue evaluado por triplicado y la media geométrica fue obtenida. Diecinueve de los aislados fueron caracterizados genéticamente para *Pvdhfr*, *Pvmdr1*, *Pvmrp1* y *Pvhdps*, genes candidatos relativamente relacionados a la resistencia a cloroquina. En este caso, doce de los 112 aislados fueron considerados resistentes a cloroquina, resultando en 10,7%, mientras 3 de los 47 fueron resistentes a mefloquina. Una correlación discreta fue observada entre los IC₅₀ de la cloroquina y mefloquina.

En Venezuela el grupo del Servicio Autónomo Centro Amazónico para Investigación y Control de Enfermedades Tropicales (SACAICET) evaluaron 62 muestras sanguíneas de pacientes con monoinfección por *P. vivax*, buscando la presencia o ausencia de la mutación Y976F en aislados circulantes en el estado Amazonas. Utilizaron el método de “*mismatch primer*” basado en la complementariedad de un *primer* interno específico para la posición polimórfica en la secuencia del gen *Pvmdr1*. Obtuvieron que el 100% (62/62) de los aislados resultaron silvestres. Asimismo, han venido realizando estudios de seguimiento *in vivo* de pacientes y cultivos *in vitro* determinando valores de IC₅₀ a fin de aportar mayores evidencias sobre la asociación de este polimorfismo en la sensibilidad del parásito a drogas antimaláricas (Vargas y col., 2013. Resultados no publicados).

JUSTIFICACIÓN

La cloroquina y la primaquina son el tratamiento de elección desde los años 60 para contrarrestar la infección malárica causada por *P. vivax*. Sin embargo, desde 1989 surge el primer caso de resistencia a la cloroquina en la región de Papúa, Nueva Guinea en donde se encontró que dos soldados provenientes de Australia, que se infectaron durante su estadía en entrenamientos militares, continuaron presentando recrudescencia de la enfermedad luego de su tratamiento con altas dosis de la misma (Rieckmann, 1989).

Posteriormente, surgieron nuevos casos en otros países como: Indonesia (Baird, 1991), India (Dua y col., 1995), La unión de Myanmar, Tailandia, Vietnam, Centro y Sur América (Baird, 2004; Lu y col., 2011).

Particularmente, en América del Sur surgen los primeros casos de resistencia a la cloroquina, en Brasil y Colombia, estudios que en un principio no se consideraron válidos debido que no se había realizado un seguimiento de la evolución clínica y parasitológica a los pacientes que estuvieron involucrados en el estudio. Es por ello, que no es sino hasta 1996 que Phillips y col. reportaron tres casos de viajeros provenientes de Guyana que se infectaron con malaria y que previamente habían sido tratados con Cloroquina y habían sufrido una recrudescencia de la enfermedad, a éstos se les realizó un seguimiento encontrándose que los parásitos presentaban resistencia al medicamento. Posteriormente, surgen casos de resistencia en Colombia (Soto y col., 2001), Perú (Ruebush y col., 2003), Brasil (de Santana Filho y col., 2007, Marques y col., 2013) y Bolivia (Añez y col., 2012).

Existe una variedad de metodologías para evaluar la eficacia y resistencia a los medicamentos antimaláricos como lo son los estudios *in vivo*, *in vitro* y moleculares. En general los estudios *in vivo* son los más utilizados para evaluar la eficacia de los medicamentos de primera y segunda línea, y para decidir si se necesitan hacer cambios en la política del tratamiento para esta parasitosis, lo que hace a esta metodología la prueba estándar para evaluar la eficacia o no de los mismos. El método más usado para estos estudios sigue los lineamientos de la OMS, los cuales fueron modificados por la OPS para estudios en América. El objetivo de estos organismos es evaluar los medicamentos antimaláricos que se usan en la actualidad como tratamiento de primera y segunda línea para

la malaria no complicada causada por *P. falciparum* y *P. vivax* y así comparar su eficacia con posibles tratamientos alternativos (AMI- RAVREDA, 2011).

Los estudios *in vitro* de quimiosensibilidad a medicamentos ayudan a explicar la sensibilidad intrínseca de los parásitos a los medicamentos antimaláricos. En donde se busca la comparación de una respuesta clínica adecuada con la falla terapéutica que puede presentar un aislado con respecto al otro.

Desde el año 2002, se ha incorporado la tecnología molecular en la búsqueda de marcadores que puedan estar asociados con la resistencia de los plasmodios a los antimaláricos como: cloroquina, mefloquina, sulfadoxina-primetamina, quinina, artesunato, entre muchos otros.

Particularmente, en Venezuela solo un estudio liderizado por el grupo del SACAICET ha venido realizando estudios moleculares (buscando la presencia o ausencia de la mutación Y976F) en aislados circulantes en el estado Amazonas, así como seguimiento *in vivo* de pacientes y valores de IC₅₀ en cultivos *in vitro* a fin de aportar mayores evidencias sobre la asociación de este polimorfismo en la sensibilidad del parásito a drogas antimaláricas (Vargas y col., 2013. Resultados no publicados).

Debido a los escasos estudios de resistencia en *P. vivax* a los antimaláricos que siguen siendo tratamiento de primera línea en Venezuela y teniendo en cuenta los antecedentes de resistencia en países vecinos. Se propone la detección de marcadores moleculares que puedan estar asociados a la resistencia de *P. vivax* a la droga de elección (cloroquina), para lo cual se plantean los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

Objetivo general

Detectar el polimorfismo Y976F en el gen *Pvmdr1* de *P. vivax* asociado a resistencia a la Cloroquina.

Objetivos específicos

1. Confirmar la infección *por P. vivax*.
2. Identificar el polimorfismo Y976F en el gen *Pvmdr1* en aislados de *P. vivax* provenientes comunidades del Estado Bolívar, Venezuela.
3. Determinar la frecuencia del polimorfismo en el gen *Pvmdr1* de *P. vivax* en las comunidades evaluadas del Estado Bolívar, Venezuela.

METODOLOGÍA

El análisis del marcador molecular Y976F en el gen *Pvmdr1* se llevó a cabo de manera retrospectiva usando muestras provenientes de comunidades del Estado Bolívar, Venezuela, existentes de proyectos anteriores.

Materiales y Métodos

Población de estudio:

Se evaluó un total de 83 personas con manifestaciones clínicas características de malaria, provenientes de comunidades endémicas del Estado Bolívar-Venezuela, que asistieron al Centro de Estudios sobre Malaria- IAE “Dr. Arnoldo Gabaldón” durante el 2014 y los primeros meses del año 2015. De las cuales fueron excluidas, niños menores de cinco años, pacientes con alteraciones mentales, alcohólicos, aquellas personas que se negaron a firmar el consentimiento informado.

Muestra biológica: Sangre completa extraída con EDTA (10 mL), de personas con clínica presuntiva de malaria, previo consentimiento informado; la cual fue obtenida con la colaboración del personal Médico y Bioanalista del Centro para Estudios sobre Malaria adscrito al Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldón”-MPPS.

Diagnostico Parasitológico: Se realizó mediante Gota Gruesa y Extendido, coloreado con Giemsa (Bruce-Chwatt, 1986; Alger, 1999; Wide y col., 2011). Se fundamenta en la observación y diferenciación morfológica de los plasmodios.

- ***Toma de Muestra de Sangre :***

El procedimiento consiste en: Limpiar el lóbulo de la oreja con un algodón ligeramente embebido en alcohol y secar el mismo con algodón seco, para evitar que quede alcohol, luego frotar ligeramente el lóbulo de la oreja para estimular la circulación. Puncionar (pinchar) el lóbulo de la oreja (o yema del dedo con un movimiento rápido), apretar ligeramente el lóbulo y

descartar la primera gota de sangre con un algodón seco. Posteriormente, se aprieta suavemente el lóbulo y se deposita una pequeña gota de sangre en el centro de la lámina, esta gota se utiliza para el extendido. Por último, apretar para extraer más sangre y depositar en un 1/3 de la misma lámina tres a cuatro gotas, para realizar la gota gruesa. Limpiar y secar el exceso de sangre en la oreja con algodón limpio.

- *Extendido de Sangre:*

Colocar la lámina con la gota de sangre sobre una superficie plana y firme o sujetarla entre los dedos pulgar e índice. Siempre utilizando guantes. Se aplica el bisel de otra lámina con borde liso sobre la gota pequeña 1,5-2 μ L, de tal manera que la sangre se extienda a lo largo de ésta, evitando que llegue a los extremos. Deslizar la lámina extensora sobre la primera, manteniendo un ángulo de 45°, la extensión debe ser realizada de forma continua y uniforme sobre la lámina sin ningún tipo de interrupciones.

- *Gota Gruesa:*

Para la realización de la misma se utiliza un ángulo de la lámina extensora, con el cual se ha de mezclar rápidamente y en forma circular las gotas de sangre, para desfibrarla. Dejar secar al abrigo de los insectos, el polvo y calor extremo, en posición horizontal por 30 minutos.

- *Coloración de Gota gruesa y Extendido de Sangre (GGES) (Modificado)*

Con el fin de observar al microscopio las muestras recogidas del lóbulo de la oreja del paciente, se procede a llevar a cabo el protocolo de la

coloración con Giemsa: fijar solo el extendido con metanol por un minuto. Luego preparar el colorante de Giemsa en el momento de realizar la coloración a una dilución 1:10 (3 a 4 gotas de colorante por un 1mL de amortiguador) utilizando 3 mL de amortiguador por cada lámina y colocar esta dilución en el espacio que queda entre la lámina porta-objeto con la muestra colocada hacia abajo sobre un soporte, durante 10 a 20 minutos. Lavar con agua de chorro y dejar secar en un área libre de polvo e insectos. Finalmente, se examina la lámina en el microscopio bajo objetivo de 100X; asegurándose de revisar previamente la gota gruesa, ya que hay mayor cantidad de sangre y por ende la probabilidad de observar los parásitos libres (si los hay) es mayor. Luego examinar el extendido para realizar el diagnóstico de especie.

Diagnóstico inmunológico

Pruebas Inmunocromatográficas.

Basadas en la captura del antígeno presente en la sangre infectada y previamente tratada con un detergente no iónico y capturado por un anticuerpo monoclonal (Ac. Mon) inmovilizado sobre un soporte sólido, normalmente una matriz de celulosa. Seguidamente esta reacción es revelada por otro anticuerpo monoclonal o policlonal mono-específico conjugado a un marcador coloreado e insoluble en medio acuoso, lo que da lugar a una línea coloreada sobre el sitio de reacción (Pérez y col. 2007).

Con la finalidad de confirmar la infección previamente determinada mediante GGES se utilizó la prueba de diagnóstico rápido (PRDx SD Bioline), para lo cual se hace uso de la muestra del lóbulo de la oreja (sangre capilar) como se explicó en la sección de “Gota Gruesa y Extendido”, o de un tubo con sangre que posee EDTA (sangre venosa), de esta se

recolectan 5 μ L con una micropipeta, la cual se coloca en la almohadilla de reacción sin tocar las paredes de la prueba. Posteriormente, se agregan 4 gotas del diluyente, que arrastra el conjugado (anticuerpo marcado con oro coloidal) contenido en la almohadilla de ensayo. Dejar desplazar la muestra (antígeno+conjugado) por capilaridad, facilitado con el diluyente colocado en el pozo anterior al de la muestra problema. Esperar 15 minutos a que se desplace la muestra acoplada al conjugado a lo largo de la tira de reacción hasta ser capturada por anticuerpos monoclonales que reconocen la HRP-2 (*P. falciparum*), pLDH (*P. vivax*) ubicados en la parte superior de la misma.

Diagnóstico Molecular:

La infección por *P. vivax* diagnosticada mediante GGES y PRDx fue confirmada a través de la técnica de PCR de dos rondas: 1) PCR Género-específica, 2) PCR Especie-específica (Snounou y col., 1993; Snounou y Singh, 2002). Sin embargo, algunas muestras fueron diagnosticadas mediante la PCR especie específica de un paso (Cunha y col., 2005). Para todas las reacciones de PCR se utilizó el termociclador de BIO-RAD, DNA Engine[®] Peltier Thermal Cycler PTC-200.

Extracción del ADN:

La extracción de ADN de la muestra de sangre obtenida por punción venosa se realizó con el kit comercial Wizard[®] Genomic DNA de Promega de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Procedimiento

Sangre colectada en EDTA. Descongelar las muestras de sangre lentamente, manteniendo los viales en hielo. Colocar 600 μ L de sangre en un tubo de 1,5 mL

Adicionar a cada vial 500 μ L de Buffer de Lisis de Células Rojas (RCLB). Mezclar suavemente por inversión. Centrifugar a 16.000 g x 2 minutos o a 12.000 g x 5 minutos, a temperatura ambiente hasta que el sobrenadante se torne claro. Adicionar 900 μ L del Buffer de Lisis Celular (Promega N° 1). Mezclar suavemente invirtiendo el tubo 5-6 veces 1 vez. Incubar la mezcla (sangre + solución de lisis celular) por 10 minutos a temperatura ambiente (invertir el tubo 2-3 veces aprox. Cada 3 minutos). Centrifugar a 12.000-16.000 g durante 2 minutos a temperatura ambiente. Remover el sobrenadante (tanto como sea posible) sin perturbar el taco o sedimento con pipeta Pasteur. Es importante que se deje un volumen remanente de 10- 20 μ L. Hacer vórtex al tubo vigorosamente durante 10-25 segundos hasta que las células blancas sean resuspendidas. Adicionar 600 μ L de la solución de Lisis Nuclear (Promega N° 2). Mezclar 5-6 veces la solución con micropipeta (usar puntas con filtro). Se incuba a 37 °C por 12-18 horas con el fin de separar las células. Dejar reposar 5 minutos en hielo y adicionar 260 μ L de Solución de precipitación de Proteínas (Promega N° 3). Hacer vórtex al tubo vigorosamente durante 25 segundos. Centrifugar a 12.000 g (6 minutos) o 16000 g (3 minutos) a temperatura ambiente. Observar un taco oscuro que contiene las proteínas, si no se observa remitirse al inserto del kit: posibles causas (sección 4). Transferir el sobrenadante a un tubo de 1,5 mL que contiene 600 μ L de isopropanol a temperatura ambiente. **Nota:** evitar aspirar todo el sobrenadante para no contaminar la solución de ADN con proteínas precipitadas. Mezclar la solución suavemente por inversión hasta que la masa de cadenas de ADN (formas de hilo) sea visible. Centrifugar a 12.000-16.000 g durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante por aspiración con micropipeta, dejando un volumen residual. Adicionar sobre el ADN 600 μ L de etanol al 70% a temperatura ambiente. Invertir el tubo suavemente varias veces para lavar el ADN y las paredes del tubo (5-6 veces). Centrifugar a 12.000-16.000 g durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante sobre una gasa y dejar escurriendo y secando el etanol en la campana de preparación de mezclas a temperatura

ambiente. Adicionar al ADN deshidratado, 50-100 μL de la **Solución de Rehidratación (Buffer TE: Promega N° 4)** por cada 600 μL de muestra de sangre inicial. Incubar a 65 °C durante 1 hora, mezclando periódicamente y suavemente la solución, o dejar a 37 °C por 12-24 horas.

Nota: En el caso de muestras de sangre no congeladas, proceder inmediatamente, manteniendo en hielo.

Detección de la infección por Plasmodium spp. mediante PCR

- PCR Género-específica

Reactivos:

Reactivo	Concentración de trabajo	Concentración final en la mezcla	Volumen tubo / μL
Agua	-----	-----	3,975
Buffer	5X	1X	2,0
MgCl ₂	25 mM	2 mM	0,8
DNTPs	2000 μM	125 μM	0,625
Primer rPLU6	10 μM	250 nM	0,25
Primer PLU 5	10 μM	250 nM	0,25
Taq Promega	5 U/ μL	1 U/ μL	0,1
ADN 0,4 ng	-----	-----	2,0
Vol. final	-----	-----	10,0

Condiciones:

Programa		
Denaturación	95 x 5 min.	
Anillaje	58 x 2 min.	25 Ciclos
Extensión	72 x 2 min.	
Denaturación	94 x 1 min.	
Anillaje final	58 x 2 min.	
Extensión final	72 x 5 min.	
	Fin	

Las secuencias de los cebadores son las siguientes:

rPLU6: 5'-TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG-3' (23 bases)

rPLU5: 5'-CCTGTTGTTGCCTTAAACTCC-3' (21 bases)

Pertenecientes a la región ribosomal 18S de *Plasmodium* spp. (Snounou y col., 1993)

- PCR Especie-específica

Reactivos:

Reactivo	Concentración de trabajo	Concentración final en la mezcla	Volumen tubo / μ L
Agua	2,8*
Buffer	5X	1X	2,0
MgCl ₂	25 mM	4 mM	1,6
DNTPs	2000 μ M	200 μ M	1,0
Primer * "F" (especie)	10 μ M	250 nM	0,25
Primer * "R" (especie)	10 μ M	250 nM	0,25
Taq Promega	5 U/ μ L	0,5 U/ μ L	0,1
ADN 0,4 ng	2,0
Vol. final	10,0

Condiciones:

Programa		
Denaturacion	94 x 4 min.	
Denaturacion	94 x 30 seg	35 Ciclos
Anillaje	58 x 1 min.	
Extensión	72 x 1 min.	
Extensión final	72 x 4 min.	
	Fin	

Las secuencias de los cebadores son las siguientes:

rVIV1: 5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3' (30 bases)

rVIV2: 5'-ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA-3' (30 bases)

Pertenecientes a la región ribosomal 18S de *P. vivax*. El producto obtenido es de 120 pb.

También se utilizarán "primers" cebadores específicos para *P. falciparum*, y así descartar aquellos individuos con infección mixta o con mono infección por *P. falciparum*

rFAL1: 5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT-3' (30 bases)

rFAL2: 5'-ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC-3' (30 bases)

Pertenecientes a la región ribosomal 18S de *P. falciparum*. El producto obtenido es de 205 pb (Snounou y Singh, 2002)

- PCR “Especie-específica de una ronda” (Cunha y col., 2009)

Detección de *P. falciparum*

Reactivos

Productos de PCR	Stock	[] Final	1 muestra
H ₂ O dd			4.3 µl
Buffer 5X	5x	1x	2µl
Primer <i>Pf antisense</i>	10 pmol/µl	10 pmol	0,5µl
Primer <i>Pf sense</i>	10 pmol/µl	10 pmol	0,5µl
KCl	50 mM	2,5 mM	0,5µl
Tris HCl	20 mM	0,4 mM	0,2µl
dNTP mix	10mM	0,2 mM	0,2µl
MgCl ₂	50 mM	3,3 mM	0,6µl
Taq platinum	5 U/µl	1,25 U	0,2 µl
AND	200µg/ml	50-100 ng	1µl
Volumen Total Mezcla			10µl

Condiciones:

Proceso	Temp. (°C)	Duración	Ciclos
Denaturación	96	5 min	
Denaturación	95	1 min	35
Anillaje	60	1 min	
Extensión	72	1 min	
Extensión Final	72	7 min	

Los cebadores a utilizar son los siguientes:

Pf1: 5'-CCTGCATTAACATCATTATATGGTACATCT-3'

Pf2:5'-GATTAACATTCTTGATGAAGTAATGATAATACCTT-3'

Los cuales corresponden a los genes de la citocromo oxidasa C, pertenecientes al genoma mitocondrial.

Se espera observar un amplificado de 273 pb aproximadamente.

Detección de P. vivax

Reactivos

Productos de PCR	Stock	[] Final	1 muestra
H ₂ O dd			4,3 µl
Buffer 5X	5x	1x	2µl
Primer Pv antisense	10 pmol/µl	10 pmol	0,5µl
Primer Pv sense	10 pmol/µl	10 pmol	0,5µl
KCl	50 mM	2,5 mM	0,5µl
Tris HCl	20 mM	0,4 mM	0,2µl
dNTP mix	10mM	0,2 mM	0,2µl
MgCl ₂	50 mM	3,3 mM	0,6µl
Taq platinum	5 U/µl	1,25 U	0,2 µl
AND	200µg/ml	50-100 ng	1µl
Volumen Total Mezcla			10µl

Condiciones:

Proceso	Temp. (°C)	Duración	Ciclos
Denaturación	96	5 min	
Denaturación	95	1 min	35
Anillaje	62	1 min	
Extensión	72	1 min	
Extensión Final	72	7 min	

Los cebadores a utilizar son los siguientes:

Pv1: 5'-AAGTGTGTGATGGGCTCATCATATG-3'

Pv2: 5'-CAAATGGAAATGAGCGATTACAT-3'

Los cuales corresponden a los genes de la citocromo oxidasa C, pertenecientes al genoma mitocondrial.

Se espera observar un amplificado de 290 pb aproximadamente.

Análisis de los productos de PCR

Los productos de PCR para las dos reacciones fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa al 1-2% (p/v), teñido en solución acuosa de Bromuro de Etidio 1 µg/mL y visualizados sobre luz UV. Los resultados se registran en un analizador de imágenes. Para el análisis de todos los geles de agarosa se utilizará el transiluminador de BIO-RAD, Gel Doc™ XR 170-8170.

Prueba de amplificación por PCR para detectar la mutación (polimorfismo) relacionadas con resistencia

Se utilizó el método de “*mismatch primer*” (apareamiento del “*cebador*”) basado en la complementariedad de un “*cebador*” interno específico para la posición polimórfica (Y976F) en la secuencia del gen *Pvmdr1* (Suwanarusk y col., 2008). En el protocolo original se realiza una sola PCR; en este caso la estandarización implicó realizar un PCR nested para asegurar la amplificación de la secuencia interna. Sin embargo, finalmente se utilizó un PCR “multiplex” debido a la aparición de productos inespecíficos y desaparición del producto de interés, en el caso anterior.

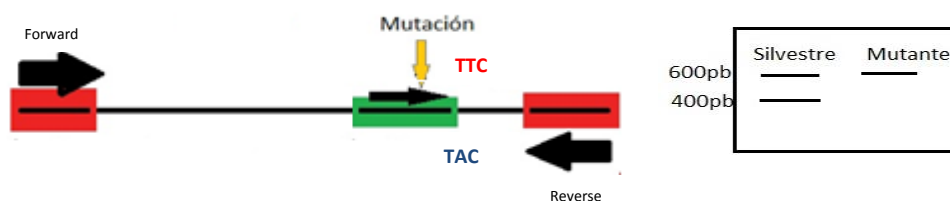


Figura 7. Esquematación de la base del método de complementariedad de “*cebador*”

Las condiciones para cada una de las reacciones y el programa se presentan a continuación

- PCR- U (Suwanarusk y col., 2007)

Reactivos	Stock	Concent. Final	Volumenes (μL)
Buffer 10X	5x	1x	4
Primer F	100μm	10μm	2
Primer R	100μm	10μm	2
dNTPmix	10mM	0,2mM	0,4
MgCl₂	50mM	2,5mM	1
Taq pol.		1U/μL	0,2
DNA			2
H₂O			8,4
Vol. total			20

- PCR “ Anidada”

Reactivos

Reactivos	Stock	Concent. Final	Volumenes (μL)
Buffer 10X	5x	1x	4
Primer F	100μm	10μm	2
Primer R	100μm	10μm	2
dNTPmix	10mM	0,2mM	0,4
MgCl₂	50mM	2,5mM	1

Taq pol.		1U/ μ L	0,2
DNA			2
H₂O			8,4
Vol. total			20

Condiciones

Proceso	Temp. (°C)	Duración	Ciclos
Denaturación	95	10 min	
Denaturación	94	40 seg	40
Anillaje	55-60	1 min	
Extensión	72	2 min	
Extensión Final	72	10 min	

- PCR Multiplex (Suwanarusk y col., 2008)

Reactivos

Productos de PCR	Stock	[] Final	1 muestra (μ L)
Buffer 5 X	5X	1X	2
pvmdr976 F	10 μ M	2 μ M	2
pvmdr976 R	10 μ M	1,5 μ M	1,5
pvmdr976 internal	10 μ M	1 μ M	1
dNTP mix	2mM	0,2 mM	1
MgCl ₂	25mM	2,5 mM	1
Taq Polimerasa		2 U/ μ L	0,2
ADN	200 μ g/ml	30ng	1,5
Volumen Total Mezcla			10 μ L

Condiciones

Proceso	Temp. (°C)	Duración	Ciclos
Denaturación	95	10 min	
Denaturación	94	40 seg	40
Anillaje	60	1 min	
Extensión	72	2 min	
Extensión Final	72	10 min	

Los iniciadores a utilizar son los siguientes:

Primer forward: 5'- GGATAGTCATGCCCCAGGATTG – 3'

Primer reverse: 5'- CATCAACTTCCCGGCGTAGC – 3'

Primer interno: 5'- CGGCTGTACTGACCGGAACGTA – 3'

Pertenecientes a los genes codificantes de un dominio transmembrana del transportador de multiresistencia a drogas 1 (mdr-1) presente en la vacuola digestiva de *P. vivax*.

Análisis de los productos de PCR

Los productos de PCR para las dos reacciones fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa al 1-2% (p/v), teñido en solución acuosa de Bromuro de Etidio 1 mg/mL y visualizados sobre luz UV. Los resultados se registran en un analizador de imágenes. Para el análisis de todos los geles de agarosa se utilizará el transiluminador de BIO-RAD, Gel Doc™ XR 170-8170.

La amplificación de dos fragmentos (605 pb y 449 pb) del gen indicará la presencia del gen silvestre y la amplificación de una sola banda (605 pb) la presencia de un mutante para ese polimorfismo.

Análisis de datos

Para el análisis de los datos se realizó una determinación de frecuencia absoluta de aparición de aislados que presentarán el polimorfismo Y976F así como su media y desviación estándar.

Aspectos éticos:

El Comité Ético Científico del IMT-UCV, emitió el AVAL respectivo para realizar la presente investigación (Anexos).

RESULTADOS

Detección de infecciones por *Plasmodium* spp mediante GGES, PRDx SD-BIOLINE y PCR

Se evaluaron 83 muestras de pacientes y en la Tabla II se observa que mediante el diagnóstico parasitológico el 100% de las mismas tenían infecciones por *P. vivax*. En cuanto al diagnóstico inmunológico, 98,80% (82/83 muestras) de las infecciones fueron por *P. vivax* y uno (1) de los aislados resultó ser negativo para ambas especies, asimismo una de las muestras resultó ser infección mixta (*P.v.+ P.f.*) lo que corresponde a un 1,20% de las muestras evaluadas. Mediante el diagnóstico molecular por PCR se encontró una prevalencia de infección por *Plasmodium* spp. del 100%, y de ese porcentaje 92,77% (77/83 muestras) francamente positivas para *P. vivax*, así mismo de las 83 muestras evaluadas el 6,02% (5/83) fueron diagnosticadas como infecciones mixtas (*P. v. + P.f.*) y 1,20 % (1/83 muestras) fue diagnosticada para *P. falciparum*.

Tabla II. Detección de infección malárica por GGES, PRDx y PCR.

	P.v. (Monoinfección)	Prevalencia (%)	P.f. (Monoinfección)	Prevalencia (%)	Negativas	Prevalencia (%)	Mixta	Prevalencia (%)
Microscopía	83	100	0	0	0	0	0	0
PRDx	81	97,59	0	0,00	1	1,19	1	1,20
PCR	77	92,77	1	1,20	0	0,00	5	6,02
		96,79		0,40		0,40		2,41

P.v.= *P. vivax* (Monoinfección); *P.f.*= *P. falciparum* (Monoinfección); Mixta= Infección Mixta (*P.v.* + *P.f.*)

Detección de infecciones por *Plasmodium* spp mediante PCR “Especie-específica”

En la Fig. 6 se observa un gel de agarosa al 2% con los productos de la PCR “Especie-específica de dos rondas”. En ambos renglones (*P. vivax* y *P. falciparum*) se muestra un marcador de tamaño (100 pb), el control universal (control correspondiente a la PCR “Género-específico”), control negativo correspondiente a una persona sin infección actual ni antecedentes maláricos por *Plasmodium* spp y un control nested (correspondiente a la PCR “Especie-específica”). En el primer renglón correspondiente a los productos obtenidos con el cebador especie-específico para *P. vivax* se muestra un control positivo para la especie con un fragmento de 120 pb; asimismo se observan muestras que presentan el mismo patrón del control positivo para la especie. En el renglón de *P. falciparum* se encuentran los productos obtenidos con el cebador especie-específico para la especie y un control positivo que corresponde a un fragmento de 205 pb y como se observa en la imagen ninguna de las muestras resultaron positivas para *P. falciparum*.

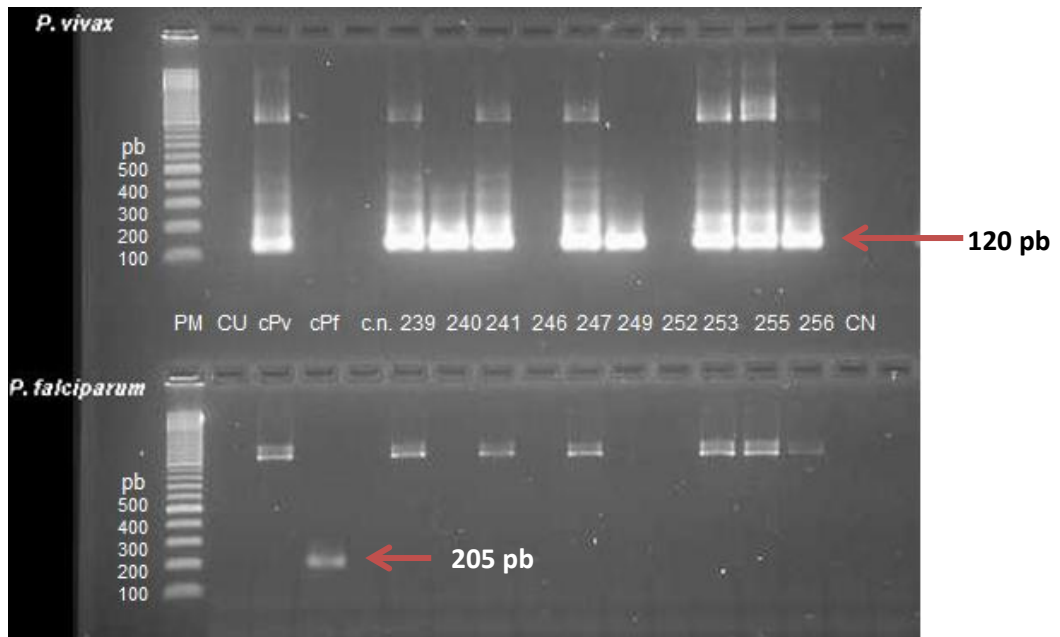


Fig. 8. PCR “Especie-específica de dos rondas” para *Plasmodium* spp. C.U. = Control de la PCR Universal (2 μ L de H₂O); C+ *P.v.*= Control Positivo *P. vivax*; C+ *P.f.*= Control Positivo *P. falciparum*; Control Negativo; C.N. = Control Nested o control interno del sistema de la segunda reacción de PCR (2 μ L de H₂O).

Algunas muestras fueron diagnosticadas mediante una PCR de una ronda. En la Fig. 9 se muestran dos geles de agarosa al 1,5%. En el **gel A** se observan los productos amplificados por los cebadores especie-específicos para *P. falciparum*, de manera que en este caso el control positivo amplificó un fragmento de 279 pb indicando que los aislados que presentaron un fragmento de igual tamaño son positivos para *P. falciparum* (348, 363, 364, 367 y 368). En el **gel B** se tiene los productos de amplificación para los cebadores especie-específicos para *P. vivax*, en el control positivo se evidencia un fragmento de 290 pb que concuerda con el tamaño del producto esperado, por lo que como se muestra en la figura que la mayoría de la muestras resultaron positivas para una infección por *P. vivax*, exceptuando la 348 que es negativa frente al cebador de *P. vivax*, pero resultó positiva para *P. falciparum*. Aunque esta muestra fue diagnosticada por GGES como infección por *P. vivax* y negativa mediante la prueba inmunocromatográfica. Al hacer una comparación de ambos geles, se hace notar la presencia de muestras que resultaron positivas para ambas especies, resultando ser infecciones mixtas, entre las cuales están las muestras: 363, 364, 367 y 368.

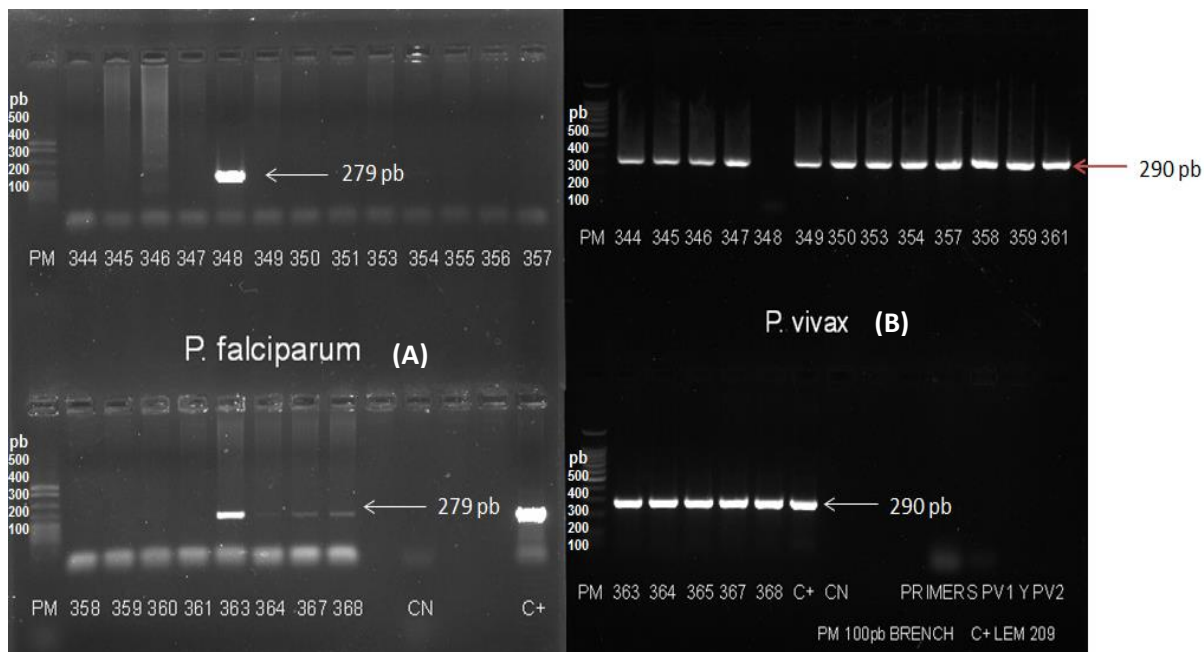


Fig. 9 PCR “Especie-específica una ronda” para *Plasmodium* spp. PM= marcador de tamaño (100 pb); CN= Control negativo (paciente sin infecciones recientes o antecedentes maláricos); C+= Control positivo para *P. falciparum* (A) y *P. vivax* (B) (persona con mono infección para cada especie en particular).

Detección del polimorfismo Y976F en el *Pvmdr1* en aislados de *P. vivax*

Estandarización de las condiciones de la PCR alelo-específico

En la Fig. 10(A) se observa que con las condiciones propuestas por Suwanarusk y col. (2007), la amplificación de los productos esperados presenta altas inespecificidades. En (B) Se mantienen las condiciones de anillaje y se disminuye la concentración del cebador hacia atrás (“Reverse”) lo que conllevó a una mayor resolución de los amplificadores esperados y una disminución de las inespecificidades. Por lo que se decidió aumentar la temperatura de anillaje (C) manteniendo las concentraciones propuestas por Suwanarusk y col. (2008) encontrándose que se redujeron las inespecificidades mucho más comparadas con las condiciones anteriores por lo que se seleccionaron estas condiciones para el resto de los ensayos.

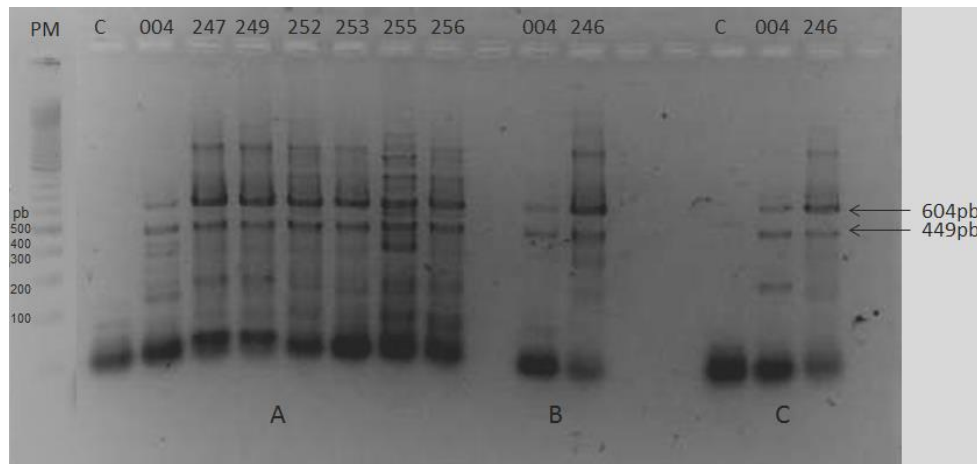


Fig. 10 Estandarización de las condiciones de PCR “Alelo- específico”. A) Anillaje a 55°C con las concentraciones de los cebadores (976F= 2µM; 976R=2µM; 976I=1µM) propuestas por Suwanarusk y col. 2007; B) Anillaje a 55°C se modifica la concentración del cebador hacia atrás (976F= 2µM; 976R=1,5µM; 976I=1µM) Suwanarusk y col. 2008; C) Anillaje a 60°C manteniendo las concentraciones anteriores (976F= 2µM; 976R=1,5µM; 976I=1µM). C= Control (2µL H₂O); 004= Control de muestra genotipo Silvestre proveniente del Edo. Amazonas (Vargas y col., 2013; Resultados no publicados).

Titulación de los Cebadores de la PCR “Alelo-específica”

Con la finalidad de mejorar la resolución de la técnica y disminuir las concentraciones de cebadores a utilizar en la misma, se realizó la titulación de los mismos y en la Fig. 11 se muestran los resultados, de manera que para las concentraciones propuestas por Suwanarusk y col. (2008) (**A**) se observa la amplificación de productos con fragmento de 605 pb y 449 pb y la amplificación de algunas inespecificidades. Al disminuir estas concentraciones como se muestra en el grupo **B** en la muestra 239 desaparece la banda de 605 pb mientras que para la muestra 280 la banda de 449 pb desaparece por completo lo que al disminuir aún más las concentraciones conlleva a la no amplificación de cualquiera de los productos anteriormente obtenidos.

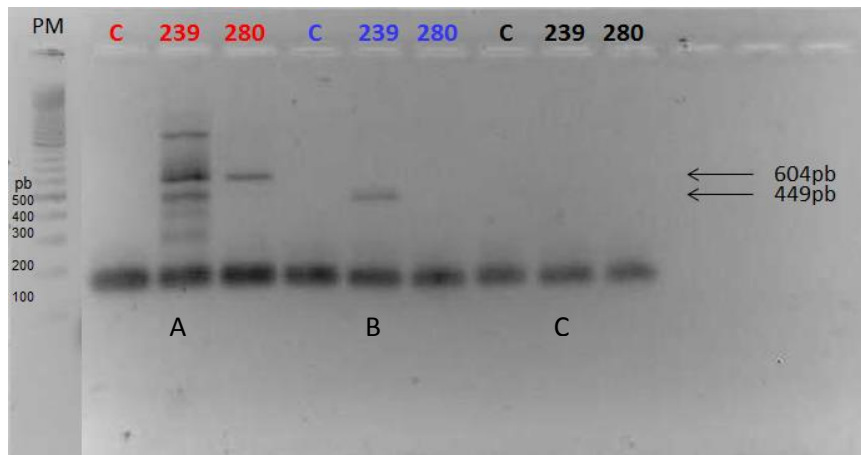


Fig. 11 Titulación de los cebadores del protocolo de PCR “Alelo- específico”. A) Concentraciones: 976F= 2 μ M; 976R= 1,5 μ M; 976I= 1 μ M propuestas por Suwanarusk y col. (2008); B) Concentraciones modificadas 976F= 1,5 μ M; 976R= 1 μ M; 976I= 0,75 μ M; C) Concentración de los cebadores: 976F= 1 μ M; 976R= 0,75 μ M; 976I= 0,5 μ M. C= Control (2 μ L H₂O); 239 y 280 aislados de pacientes diagnosticados en el Centro para Estudios sobre Malaria-IAE “Dr. Arnoldo Gabaldón”.

Identificación del Polimorfismo Y976F en aislados de *P. vivax*

En la Fig. 12 se muestra un gel de agarosa al 2% con los productos obtenidos de la PCR “Alelo-específico” en la imagen A se observa la detección del polimorfismo en múltiples aislados los cuales en su mayoría presentan un patrón de dos bandas de 605 pb y 449 pb característico del genotipo silvestre para el polimorfismo, en aquellas en donde no se observa amplificado (muestras 358, 360, 361 y 364) posteriormente se verificó la presencia del producto aumentando el volumen de muestra en la corrida y se encontró que presentaban el genotipo silvestre al igual que las anteriores. Por otro lado, la muestra 348 que según su diagnóstico por PCR resultó ser positiva para *P. falciparum* y que en este caso no devala ningún tipo de reacción con los cebadores implementado, esto se realizo con la finalidad de verificar la especificidad de los cebadores. En la imagen B se presentan tres muestras (239, 241 y 255) con dos bandas correspondientes a fragmentos de ADN de 605 pb y 449 pb, lo que devala el patrón característico de un aislado que presenta el genotipo silvestre para la misma (Y976). Este patrón difiere del observado en el resto de las muestras (280, 290 y 338)

en el cual solo amplifica un producto de 605 pb, lo cual corresponde al patrón característico de un aislado que presenta el genotipo mutante.

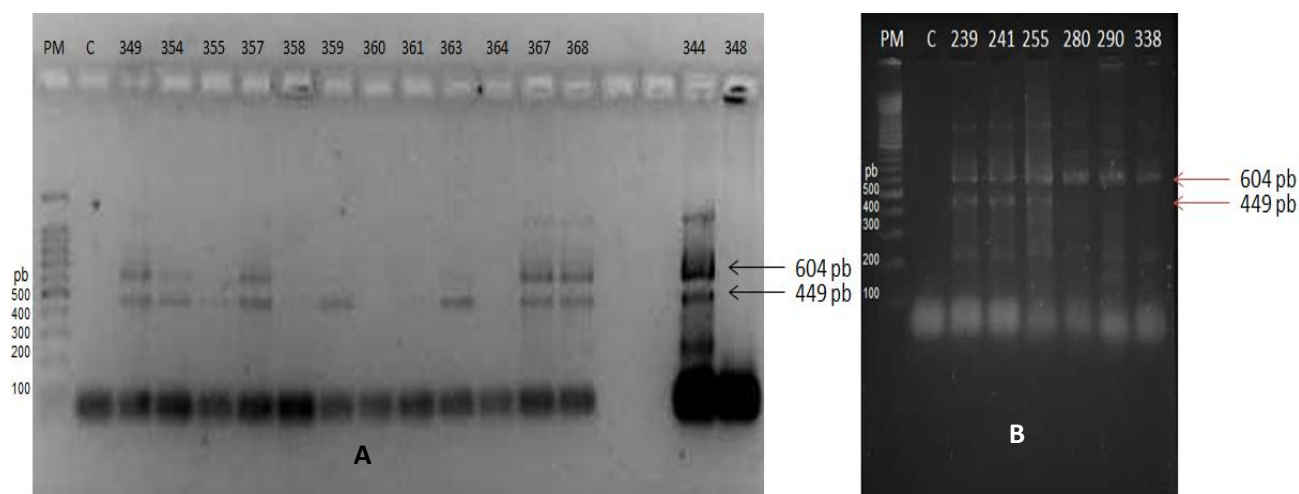


Fig. 12 Detección del Polimorfismo Y976F en aislados de *P. vivax*. PM= Marcador de Tamaño (100 pb); C=Control (2 μ L de H₂O); Carriles enumerados corresponden a los aislados evaluados para la detección del polimorfismo Y976F, que corresponden a pacientes diagnosticados para malaria por *P. vivax* en el Centro para Estudios sobre Malaria- IAE “Dr. Arnoldo Gabaldón”. A) Se indica la presencia de un aislado positivo para *P. falciparum* (348) y en B) se observan, las variantes encontradas con respecto al polimorfismo en donde las muestras 239, 241 y 255 presentan el genotipo silvestre (Y976) mientras que las muestras 280, 290 y 338 presentan el genotipo mutante (976F)

Frecuencia del Polimorfismo Y976F en aislados provenientes de comunidades del Edo. Bolívar.

La Tabla III y Fig. 13 muestra la distribución de los aislados silvestres y mutantes por regiones en Venezuela, observándose que en el Edo. Bolívar, particularmente el Municipio Sifontes presenta el mayor número de casos de infecciones malaricas, así como la mayor frecuencia de aparición del genotipo silvestre del polimorfismo Y976F.

Por otro lado, se encontraron tres aislados con la mutación para el polimorfismo Y976F, dos de las cuales provenían del Municipio Gran Sabana y un tercer aislado provenientes de Higuerote, Edo. Miranda, cabe destacar que se incluyeron aislados de esta

zona ya que son producto de un caso índice que provenía de las minas del Edo. Bolívar y que promovió el brote epidémico en esta región no endémica para malaria.

Tabla III. Frecuencia del Polimorfismo Y976F en aislados de *P. vivax*

Localidad	N° de casos	N° de casos con Y976 (Silvestre)	N° casos con 976F (Mutante)
Mun. Cedeño	1	1	0
Mun. Heres	2	2	0
Mun. El Callao	1	1	0
Mun. Gran Sabana	8	6	2
Mun. Sucre	1	1	0
Municipio ND, Edo. Bolívar	8	8	0
Mun. Piar	1	1	0
Mun. Sifontes	54	54	0
Zona en Reclamación	4	4	0
Higuerote, Edo. Miranda	3	2	1
Total de casos	83	80	3
Media	8,30	8,00	0,3
Desv. Estand.	16,29	16,34	0,67
Prevalencia del SNP Y976F (%)		96,39	3,61

Mun.= Municipio

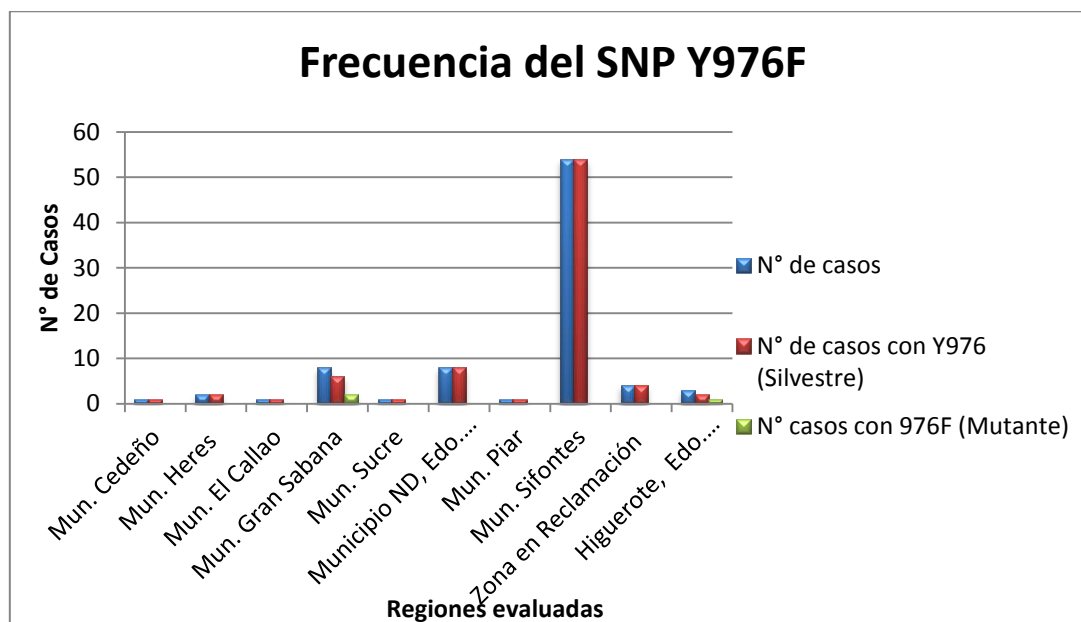


Fig. 13 Frecuencia del Polimorfismo Y976F en aislados de *P. vivax* por regiones.

En la Tabla IV y Fig.14 se muestra el número de casos de infecciones causadas por aislados de *P. vivax* que presentan el polimorfismo Y976F en su forma silvestre (Y976) y mutante (976F), pudiéndose observar una prevalencia de 96,39% de aislados silvestre y un 3,61% de aislados mutantes.

Tabla IV. Prevalencia del Polimorfismo Y976F en aislados de *P. vivax*

Polimorfismo	n	Prevalencia (%)
Y976 (Silvestre)	80	96,39
976F (mutante)	3	3,61
Total	83	

Y976= Alelo Silvestre; 976F= Alelo Mutante

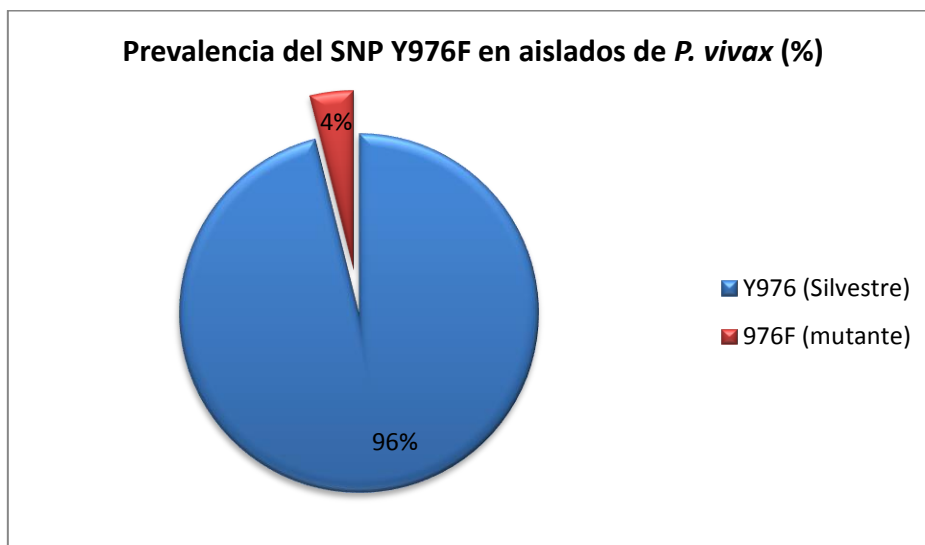


Fig. 14 Prevalencia del SNP Y976F en aislados con infección por *P. vivax*

DISCUSIÓN

La malaria o paludismo, presenta alta prevalencia en varias regiones del mundo, incluyendo a Venezuela. En el país, el foco meridional aporta el 90,3% de los casos de malaria hasta la fecha, donde además coexisten las tres especies de *Plasmodium*, lo cual ha conllevado al incremento de infecciones mixtas (Boletín Integral de Salud Ambiental, Semana N° 36- Dirección General de Salud Ambiental-MPPS, 2015). Esto obliga a hacer un diagnóstico confirmatorio a través del uso de métodos inmunológicos y/o moleculares antes de suministrar el tratamiento antimalárico ya que para cada especie existe un esquema terapéutico específico. Sin embargo, la respuesta al tratamiento antimalárico es multifactorial, dependiendo de las características biológicas del parásito, constitución genética de la población, estacionalidad de la transmisión, metabolismo de la droga, de la respuesta inmunitaria del hospedador y presencia de genes de resistencia (Wellems y Plowe, 2001).

En esta propuesta se evaluaron 83 aislados provenientes de comunidades de diferentes municipios del Edo. Bolívar, el cual es el más importante en la casuística de malaria y la especie predominante es *P. vivax*. Es importante acotar que se incluyeron aislados de pacientes que geográficamente estaban residenciados en el estado Miranda, y que habían permanecido en áreas endémicas del Edo. Bolívar en donde adquirieron la infección malárica. Los pacientes fueron inicialmente diagnosticados mediante Gota Gruesa y Extendido de sangre resultando positivos para *P. vivax*. Al aplicar la Prueba Inmunocromatográfica se confirmó el diagnóstico parasitológico, exceptuando la muestra 348 que resultó negativa y la muestra 349 que resultó mixta.

Los resultados anteriores permiten inferir que la parasitemia en las muestras evaluadas era muy baja o que el observador de las mismas siendo altamente entrenado pudo haber

confundido los estadios evolutivos en sangre de una especie con la otra particularmente en infecciones muy recientes, ya que en algunos casos los estadios más jóvenes de las especies inicialmente no presentan hipertrofia del glóbulo rojo, pudiéndose confundir principalmente con *P. falciparum*. Aunque *P. vivax* infecta reticulocitos que están en una proporción de alrededor de un 1% y *P. falciparum* infecta glóbulos rojos jóvenes y maduros la parasitemia será mayor en las infecciones por *P. falciparum*. Sin embargo, ante una infección mixta (*P.v.* + *P.f.*) puede presentarse dominancia de *P. vivax* ya que *P. falciparum* realiza su esquizogonia en la circulación profunda mientras que la primera realiza la esquizogonia en circulación periférica.

No obstante, al realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como método confirmatorio de la infección se observaron discrepancias, encontrándose cinco casos de infecciones mixtas (*P.v.* + *P.f.*) y un caso positivo para *P. falciparum* (Tabla I). Se ha reportado que la sensibilidad y especificidad de la PCR como método diagnóstico puede tomar valores del 99-100% en ambos casos (Alger, 1999). Aunque en este caso no fue posible hacer una comparación entre las modalidades de PCR de una y dos rondas, por no haberse evaluado las mismas muestras bajo ambas condiciones, cabe destacar que la PCR de una ronda proporciona resultados en menor tiempo, lo que permite tomar una conducta terapéutica oportuna.

En cuanto a la prueba Inmunocromatográfica SD-Bioline, detecta la presencia de un antígeno de excreción- secreción de *P. falciparum* (HRP-2) que entra en la circulación periférica. Para el caso de *P. vivax* se reconoce la enzima lactato deshidrogenasa (pDHL) que es constitutiva de la vía glicolítica del parásito; ambos antígenos dependen del nivel de parasitemia, volviéndose indetectables por los anticuerpos de la prueba cuando la misma es muy baja (< 120 parásitos/ μ L de sangre), lo que explicaría por qué al utilizarse este método

también fueron pasadas por alto la infección de *P. falciparum* como en el caso de la muestra 348 y cuatro infecciones mixtas adicionales posteriormente, aun cuando esta prueba por lo general, tiene una sensibilidad de 88,1- 98,7 % (Mendoza y col., 2013; Herrera y col., 2014).

Las complicaciones letales se han observado principalmente en *P. falciparum*, sin embargo, hay reportes de severidad en el caso de *P. vivax*. Particularmente para esta especie la cloroquina forma parte del esquema terapéutico. Uno de los factores que influyen la respuesta al tratamiento antimalárico es la presencia de genes de resistencia (Wellems y Plowe, 2001).

La aparición y dispersión de aislados de plasmodios resistentes a los antimaláricos, particularmente en *P. falciparum* ha sido uno de los factores relevantes en el aumento de casos de malaria en las últimas décadas. Esta resistencia se ha presentado hacia todas las drogas, exceptuando a los derivados de artemisina. Las drogas más utilizadas han sido la cloroquina y la pirimetamina/ sulfadoxina (FANSIDAR), y por ende la resistencia a esta ha conllevado a un aumento de la morbilidad y mortalidad por esta parasitosis.

Las estrategias para evaluar la resistencia de *Plasmodium* spp a los antimaláricos ha sido mediante ensayos *in vivo*, *in vitro* y a través de marcadores moleculares.

La implementación de la PCR “Alelo-específica (mismatch primer)” para la detección de mutaciones asociadas a resistencia en este particular fue altamente específica para los genes de *P. vivax* ya que frente a aislados de *P. falciparum* no se observa amplificación de los productos esperados. Por otra parte, la presencia de infecciones mixtas no interfiere con la detección del polimorfismo Y976F. Aunque en este caso, en las infecciones mixtas se

encontró solo el genotipo silvestre sería interesante indagar en la posibilidad de que existiese algún aislado con el genotipo mutante en presencia de *P. falciparum*.

Considerando que los parásitos con el genotipo mutante pudiesen no estar adecuados a la presencia de *P. falciparum* en el mismo nicho ecológico, en su necesidad de mantener la capacidad funcional del transportador evitando la pérdida de metabolitos obtenidos de la digestión de la hemoglobina, ya que esto pudiese garantizar el mantenimiento de la especie.

En *P. vivax* se han reportado casos de resistencia desde 1989, año en el cual surge el primer caso de resistencia a la cloroquina en la región de Papúa, Nueva Guinea (Rieckmann, 1989). Posteriormente, surgieron nuevos casos en otros países como: Indonesia (Baird, 1991), India (Dua y col., 1995), La unión de Myanmar, Tailandia, Vietnam, Centro y Sur América (Baird, 2004; Lu y col., 2011).

Particularmente, en América del Sur surgen los primeros casos de resistencia, en Brasil (de Santana Filho y col., 2007, Marques y col., 2013), Guyana (Phillips y col., 1996), posteriormente en Colombia (Soto y col., 2001), Perú (Ruebush y col., 2003) y Bolivia (Añez y col., 2012).

La información genética de marcadores moleculares de resistencia es una herramienta epidemiológica útil para la detección temprana de focos de resistencia a los antimaláricos (Gascón, 2005). El gen de multiresistencia a drogas 1 (*Pvmdr1*) de *P. vivax*, homólogo al *Pfmdr* en *P. falciparum*, ha sido estudiado como marcador molecular de resistencia. Estudios, han reportado anteriormente la presencia de dos polimorfismos Y976F y F1076L, los cuales son relativamente infrecuentes en Latinoamérica, en donde la resistencia a

cloroquina de *P. vivax* es poco común, aunque la variante Y976F puede alcanzar altos niveles de prevalencia en el Este de la Amazonia (Goncalves, 2014).

El presente trabajo representa uno de los primeros intentos realizados en el país enfocado a investigar la presencia de marcadores moleculares a cloroquina en *P. vivax*. De manera que al evaluar muestras provenientes del Edo. Bolívar y utilizando la técnica de la PCR “Alelo-específico (mismatch primer)” se encontró la presencia de aislados silvestres para el polimorfismo Y976F en una proporción del 96,39% con respecto a un 3,61% del alelo mutante (Tabla III). En un estudio previo realizado con aislados de diferentes municipios del Edo. Amazonas se detectó y confirmó por secuenciación la presencia de alelos silvestres para la posición polimórfica Y976F en el 100% (62/62) de los aislados (Vargas y col., 2013). Otros autores han reportado el 39% de prevalencia del genotipo mutante, en la Provincia de Madang (Marfurt, 2008); 17,9% en aislados provenientes de Tailandia, 13,3% en Myanmar y 100% en aislados de Papua Nueva Guinea presentaron el alelo mutante para este polimorfismo (Feng, 2011); 100% aislados fueron silvestres en Pakistan (Khattack y col., 2013); Suwanarusk y col. (2007) reportaron que en Indonesia existía una prevalencia de la mutación para este marcador del 96% mientras que para aislados de Tailandia fue del 43%; en la Amazonia Brasileña se encontró que el 10,7% de los aislados presentaban la mutación asociada a la resistencia a cloroquina (Chechuan, 2013).

Generalmente la aplicación del Equilibrio Hardy-Weinberg, contituiría una herramienta útil para determinar la frecuencia alélica a nivel poblacional en este tipo de estudio. Sin embargo, en este caso debido a la baja frecuencia de aparición y a un tamaño de muestra relativamente bajo no factible su aplicación.

La prevalencia de aislados tanto silvestres como mutantes varía según el área endémica y la dispersión de los mismos, siendo predominante la presencia de alelos silvestres con respecto al mutante. Es un hecho relevante que el Municipio Sifontes, siendo el más importante en la casuística de malaria del Edo. Bolívar circule únicamente el genotipo silvestre, se esperaría que debido a la presencia de diferentes comunidades endémicas que se encuentran en constante movilización como resultado de la minería, aunado a la presión selectiva del uso indiscriminado de los antimaláricos particularmente la cloroquina hubiese la presencia de al menos un aislado mutante.

Por otra parte, es importante hacer notar la presencia de aislados resistentes en Brasil, un país vecino ya que pudiese inferirse que los aislados de *P. vivax* circulantes, que presenta la mutación 976F asociada a resistencia a cloroquina en el Edo. Bolívar podrían ser importadas de esta nación, ya que los pacientes en los cuales se encontró la misma provenían del municipio Gran Sabana, el cual constituye un lindero fronterizo entre ambos países, con un marcado intercambio comercial y turístico.

No fue posible determinar la asociación de la falla terapéutica de los pacientes con el aislado mutantes, debido a la dificultad de hacer el seguimiento post-tratamiento. Por lo que sería relevante en estudios a posteriori la estimación de la correlación entre ambos factores, los cuales de algún modo influyen en la respuesta al tratamiento.

La presencia en aislados importados por viajeros desde zonas endémicas sugiere el rápido desarrollo y la dispersión de resistencia a la mayoría de los antimaláricos comúnmente usados para controlar esta parasitosis (Gascón, 2005). Tal es el caso, del aislado mutante proveniente del Edo. Miranda, cuyo origen de infección correspondió a alguna zona endémica del Edo. Bolívar. Esto demuestra la importancia epidemiológica de los viajeros a

zonas endémicas que al regresar a su sitio de residencia en donde exista una población de anofelinos pueda darse la dispersión de aislados tanto silvestres como mutantes.

Para la PCR “Alelo- específica” (*mismatch primer*) la discriminación de clones con el genotipo silvestre y mutante presente en un mismo aislado representa una limitante, debido a que esta metodología presenta inconveniente con la detección de mutaciones puntuales en un amplio espectro de aislados por lo que generalmente se recomienda la combinación de otras metodologías confirmatoria tales como la secuenciación. Por lo que en este caso la diferenciación de las variantes del Y976F en un mismo “pool” de aislados no fue posible.

Es importante acotar que Suwanarusk y col. luego de evaluar numerosos aislados a través de la secuenciación, sugieren que la metodología es confiable para asegurar que la amplificación de los productos esperados tanto para el genotipo silvestre como para el mutante se corresponde con la secuencia encontrada en los aislados según fuese el caso.

La aparición de aislados mutantes, a este y otros marcadores debería representar una alerta sobre los cambios que ocurren en áreas endémicas, ofreciendo así información adicional importante en la toma de políticas en cuanto a la incorporación de las drogas antimaláricas, de tal manera que la búsqueda de marcadores moleculares de resistencia podrían representar una herramienta epidemiológica útil para la detección temprana de focos de resistencia.

Es por ello que los resultados obtenidos en este trabajo podrían servir como línea de base para implementar una vigilancia molecular que representaría una estrategia complementaria importante en la predicción de la sensibilidad a los medicamentos

antimaláricos y en consecuencia cuándo cambiar los esquemas terapéuticos en el programa de control de la malaria.

CONCLUSIONES

- Se confirma que la técnica de Reacción en Cadena de la polimerasa resultó ser más sensible que la “gold estándar” y la inmunocromatográfica en la detección de monoinfecciones por *P. vivax*.
- Se detectó la variabilidad del gen *Pvmdr1* en aislados de *P. vivax* provenientes del Estado Bolívar.
- La frecuencia de la variante Y976F en los aislados evaluados permite considerarlo un polimorfismo.
- Los cebadores utilizados en la identificación de *Pvmdr1* son específicos para *P. vivax*.
- Los aislados co-infectados (infecciones mixtas) presentaron el genotipo silvestre del gen *Pvmdr1*.
- La presencia de aislados mutados en zonas no endémicas para malaria pudiera conllevar a la dispersión de aislados resistentes a la cloroquina en el país.

Recomendaciones:

- Evaluar aislados de todos los focos endémicos del país, incrementando el N muestral
- Mapear niveles potenciales de resistencia investigando la presencia de mutaciones en los codones relevantes de genes asociados a resistencias en aislados de *P. vivax* autóctonos y/o importados en regiones endémicas del país.
- Correlacionar la presencia de marcadores de resistencia a fármacos con la respuesta de los aislados en cultivos *in vitro* y/o seguimientos *in vivo*, este último con la finalidad de adoptar cambios en el esquema terapéutico.
- Elevar a los entes competentes la necesidad de implementar estrategias de vigilancia temporal y espacial de estos marcadores biológicos, con la finalidad de observar la posible influencia de los mismos sobre la terapia en el momento.
- Evaluar la variabilidad del gen *Pvmdr1* en un mayor número de muestra de aislados con infecciones mixtas.
- Evaluar la variabilidad de genes involucrados en el metabolismo de la droga en el parásito.
- Secuenciar los productos amplificados para confirmar la presencia de la mutación puntual en aislados de *P. vivax* provenientes del Estado Bolívar.
- Determinar el número de copias del gen *Pvmdr1* ya que podría condicionar el grado de resistencia de los aislados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alger, J. (1999). Diagnostico Microscópico de la Malaria Gota Gruesa y Extendido Fino. Rev. Méd. de Honduras 67:216-218.
2. Antunes Goncalves, L., Cravo, P. y Urbano Ferreira, M. (2014). Emerging Plasmodium vivax resistance to chloroquine in South America: an overview. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 109 (5).
3. Añez, A., Navarro-Costa, D., Yucra, O., Garnica, C., Melgar, V., Moscoso, M., Arteaga, R., Nakao, G. (2012). Respuesta terapéutica de Plasmodium vivax a la cloroquina en Riberalta, Guayamerin y Yacuiba, Bolivia. Biomédica. 32: 527- 535.
4. Apt Baruch, W. L.(2013). Parasitología Humana. Cap. 43. Carnevale, Pierre e Izri,Arezki Paludismo (malaria). Mc Graw & Hill.
5. Baird, J.K., Basri, H., Bangs, M.J., Subianto, B., Patchen, L.C., Hoffman S.L. (1991). Resistance to chloroquine by Plasmodium vivax in Irian Jaya, Indonesia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 44 (5):547-552.
6. Barnadas, C., Gray, L. R., Kent, D., Iga, J., Siba, P., Timinao, L., Thomas, J., Zimmerman, P.(2011). A new high-throughput method for simultaneous detection of drug resistance associated mutations in Plasmodium vivax dhfr,dhps y mdr1 genes. Mal. J. 10: 282.
7. Barnadas, C., Ratsimbaoa, A., Tichit, M., Bouchier, C., Jahevitra, M., Picot, S., Ménrad, D. (2008). Plasmodium vivax Resistance to Chloroquine in Madagascar: Clinical Efficacy and Polymorphisms in pvmdr 1 y pvcr1-o Genes. Antimicrob. Agents and Chemoter. 52 (12) 4233-4240.
8. Bidwell, J. y Navarrete C. (2000) Histocompatibility Testing. pp. 149-179. Bunce, M. PCR-SPP Typing. Imperial College Press.
9. Boletín Epidemiológico Semanal (2014). Semana N° 52. Ministerio del Poder Popular para la Salud.
10. Brega, S., de Monbrison, F., Severini, C., Udomsangpetch, R., Sutanto, I., Ruckert, P., Peyron, F., Picot S. (2004). Real- Time PCR for Dihydrofolate Reductase Gene Single-Nucleotide Polymorphisms in Plasmodium vivax Isolates. Antimicrob. Agents Chemoter. (48) 7: 2581-2587.

11. Brega, S., de Monbrison, F., Severini, C., Udomsangpetch, R., Sutanto, I., Gardoni, L., Ruckert, P., Peyron, F., Picot S. (2005). Identification of the *Plasmodium vivax* mdr-like gene (Pvmdr1) and Analysis of Single-Nucleotide Polymorphisms among Isolates from different areas of endemicity. J. Infect Dis. 191 (2):272-277.
12. Bruce-Chwatt L.J. (1986). Essential Malariology. 2^{da} Edition. William Heinemann Medical Books Ltd. London.
13. Castillo, A., Chaparro, V., Tahidid N., Magris M. (2012). Detección de la mutación Y976F en el gen Pvmdr1 de *Plasmodium vivax* en el Estado Amazonas, Venezuela. Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología.
14. Chehuan, Y. F., Costa, M. R.F., Costa, J. S., Alecrim, M. G.C., Nogueira, F., Silveira, E., Brasil, L.W., Melo, G. C., Monteiro, W. M., Lacerda, M. VG. (2013). In vitro chloroquine resistance forma *Plasmodium vivax* isolates from the Western Brazilian Amazon. Malaria Journal 12: 226.
15. Chinappi, M., Via, A. A., Marcatilli, P., Tramontano, A. (2010). On the mechanism of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. Plos One. 5 (11) e14064.
16. Clark, M. A., Finkel, R., Rey, J. A., Whalen, K. (2012). Pharmacology. 5ta Edicion. Edit. Lippincott Williams & Wilkins. China. Unidad VII p.p. 447.
17. Cunha, M., Medina, T., Oliviera, S., Marinho, A., Póvoa, M., Ribeiro-dos-Santos, A. (2009). Development of a Polymarase Chain Reaction (PCR) method base don amplification of mitochondrial DNA to detect *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. Acta Trop. 111 35-38.
18. De Santana Filho, F. S., de Lima Arcanjo, A. R., Melo Chehuan, Y., Costa, M. R., Martinez-espinoza F. y colaboradores (2007). Chloroquine Resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amzon. Emerging Infectious Diseasses. 13 (7) : 1125-1126.
19. Documento estratégico para el monitoreo de la eficacia y resistencia de los antimalaricos en el contexto actual epidemiológico. (2011). Iniciativa Amazonica contra la Malaria- Red Amazonica de Vilancia de la Resistencia a los Antimalaricos. OPS
20. Dua, V.K., Kar, P.K., Sharma V. P. (1996). Chloroquine resistant *Plasmodium vivax* malaria in India. Trop. Med. And Int. Health. 1 (6) : 816-819.

21. Feng, L., Seung Lim, Ch., Nam, D., Kim, K., Lin, K., Kim, T., Lee, Hyeong-Woo, Chen, Jun-Hu, Wang, Yue, Sattabongkot, Jetsumon, Han, Eun-Taek (2011). Genetic polymorphism in *Pvmdr1* and *pvcrt-0* genes in relation to in vitro drug susceptibility of *Plasmodium vivax* isolates from malaria-endemic countries. Acta Trópica 117: 69-75.
22. Feng, L., Wang, B., Cao, J., Sattabongkot, J., Zhou, H., Zhu, G., Kim, K., Gao, Q., Han, E-T (2012). Prevalence of Drug Resistance-Associated Gene Mutations in *Plasmodium vivax* in Central China. Korean J. 50 (4) 379-384.
23. Foote, S. J. y Cowman, A.F. (1994). The mode of action and mechanism of resistance to antimalarial drugs. Acta Tropica 56. 157-171.
24. Foote, S., Thompson, J. K., Cowman, A. F., Kemp., D. J. (1989). Amplification of the Multidrug Resistance Gene in Some Chloroquine-Resistant Isolates of *P. falciparum*. Cell, vol. 57, 921-930.
25. Gabaldon, A., Medioca, T y Castellani, O. (1971). La resistencia de los parasitos malaricos a las drogas en Venezuela. Boletin Informativo de la Direccion de Malariología y Saneamiento Ambiental. Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. 9 : 22-46.
26. Galindo, J. A., Cristiano, F. A., Krudson, A., Nicholls, R. S., Guerra, A. P. (2010). Mutaciones puntuales en los genes *dhfr* y *dhps* de *Plasmodium falciparum* de tres regiones endémicas para malaria en Colombia. Biomédica (30) 56-64.
27. Gascon, J., Mayor, A., Mühiberger, N., Peyerl-Hoffman, G., Oliveira, Dobaño, C., Jlinel, T., Corachan, M. (2005). Vigilancia epidemiológica mediante marcadores moleculares de resistencia frente a antimalaricos en *Plasmodium falciparum* importados a Barcelona, España. Med. Clin (Barc.) 125 (8) 286-289.
28. Hayward, K., Saliba, K. J. y Kirk, K. (2005). *Pfmdr1* associated with chloroquine resistance incur a fitness cost in *Plasmodium falciparum*. Mol. Microbiology, 55 (4) 1285-1295.
29. Herrera, S., Vallejo, A., Quintero, J.P., Arevalo-Herrera, M., Cancino, M., Ferro, S. (2014). Field of an automated RDT reader and dta management device for *Plasmodium falciparum/Plasmodium vivax* malaria in endemic areas of Colombia. Malaria Journal 13:87.

30. Imwong, M., Pukrittayakamee, S., Pongtavornpinyo, W., Nakeeathit, S., Nair, S., Newton, P., Nosten F., Anderson, T. J. C., Day, N. P. J. y White, N. J. (2008). Gene Amplification of the Multidrug Resistance 1 Gene of *Plasmodium vivax* Isolates from Thailand, Laos y Myanmar. *Antim. Ag. And Chem.* 52 (7) 2657-2659.
31. Klein, E.Y. (2013). Antimalarial drug resistance: a review of the biology and strategies to delay emergence an spread. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 41:311-317.
32. Knell, A. J. (1991). Malaria. A Publication of the Tropical Programme of The Welcome Trust.
33. Maberti S. (1960). Desarrollo de la Resistencia a la Pirimetamina. *Arch. Ven. Med. Trop. Parasitol. Med.* 3 (2):239-259.
34. Manguin, S., Carnevale Mouchet P., Coosemans, M., Julvez, J., Lenoble, R., Sircoulon, J.. Biodiversity of Malaria in the World. (2008). Editorial: John Libbey. Eurotext. p.p. 354
35. Marfurt, J., de Monbrison, F., Brega, S., Barbollat, L., Müller, I., Sie, A., Goroti, M., Reeder, J. C., Beck, H.-P., Picot, S., Genton, B. (2008). Molecular markes of In Vivo *Plasmodium vivax* Resistance to Amodiaquine plus Sulfadoxine-Pyrimethamine: Mutations in *pvdhfr* y *Pvmdr1*. *J. Infect. Dis.* 198 (3): 409-417.
36. Marques, M., Costa, Monica R.F., Santana Filho, F. S., Vieira, J. L., Nascimento, M.T.S., Brasil, L.W., Nogueira, F. y colaboradores (2013). *Plasmodium vivax* Chloroquine resistance and anemia in western Brazilian Amazon. *Antimicrob. Agents and Chemot.* 58 (1):342-347.
37. Mayers, D.L. (2009) Antimicrobial Drug Resistance. Volume 1 Mechanisms of Drug Resistance. Springer Dordrecht Heidelberg. New York, USA.
38. Mekonnen, S. K., Aseffa, A., Berhe, N., Teklehaymanot, T., Clouse, R. M., Gebru, T., Medhin G., Velavan, T. P. (2014). Return of cloroquine- sensitive *Plasmodium falciparum* parasites an emergence of chloroquine- resistant *Plasmodium vivax* in Ethiopia. 13: 244.
39. Melo, G., Monteiro, W. M., Siqueira, A.M., Silva, S., Magalães, A., Aline, K. A., del Portillo, H., Fernandez-Becerra, C., Lacerda, M. (2014). Epression Levels of *pvcrt-o* y *Pvmdr1* are associated with chloroquine resistance and severe

- Plasmodium vivax malaria in patients of the Brazilian Amazon. Plos One. 9 (8) e: 105922.
40. Mendoza, N, Cucunubá, Z., Aponte, S., Gonzalez, N., Surley, S. (2013). Evaluación de campo de la precisión de la prueba de diagnóstico rápido SD-Bioline Malaria Antigen P.f./P.v. en Colombia. Biomédica.
41. Ministerio del Poder Popular para la Salud (2015). Boletín Integral de Salud Ambiental. Semana 25 (21 al 27 junio)
42. Mueller, I., Galinski, M. R., Baird, K., Carlton, J. M., Kochar, D., Alonso, P. L., Del Portillo H. (2009). Key gaps in the knowledge of Plasmodium vivax, a neglected human malaria parasite. The Lancet 9 (9) 555-556
43. Mungthin, M., Bray, P., Ridley R. G., Wrad, S. A. (1998). Central role of Hemoglobin Degradation in Machanism of action of 4-Aminoquinolines, quinolines methanols and phenantrene methanols. Antimicrob. Agen. Chem. 42 (11):2973-2977.
44. Organización Mundial de la Salud (2010). Guidelines for the Treatment of Malaria. 2da Edición. Geneva, Suiza
45. Organización Mundial de la Salud (2013). Reporte Mundial de Malaria. Geneva, Suiza.
46. Organización Mundial de la Salud (2014). Reporte Mundial de Malaria. Geneva, Suiza.
47. Orjuela- Sanchez, P., de Santana Filho, F., Machado-Lima, A., Chehuan, Y. F., Farias C., Mônica R., Costa A., M., del Portillo, Hernando (2009). Analysis of Single-Nucleotide Polymorphisms in the crt-o and mdr1 Genes of Plasmodium vivax among Chloroquine- Resistant Isolates from the Brazilian Amazon Region. Antim. Ag. and Chem. 53 (8) 3561- 3564.
48. Patrinos, G. P., Ans, W. (2010). Molecular Diagnostic. Cap. 2. Athanassiadou, A., Stavrou, E., Papachatzopoulou, A., Patrinos, G. Allele-specificMutation Detection. Elsevier, Londres, Reino Unido.
49. Phillips, E.J., Keystone, J.S., Kain, K.C. (1996). Failure of Combined Chloroquine and High-dose Primaquine Therapy for Plasmodium vivax malaria Acquired in Guyana, South America. Clinical Infections Diseases. 23:1171-1173.

50. Price, R. N., von Seidlein, L., Valecha, N., Nosten, F., Baird, J. K., White Nicholas J. (2014). Global extent of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*: a systematic methanalysis. Lancet Infect. Dis. 14: 982-991.
51. Rieckmann, K.H., Davis, D.R., Hutton, D.C. (1989). *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? Lancet 2:1183-1184.
52. Rodak, F. B. Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas. 2da Edición. Editorial Panamericana. p.p. 884.
53. Ruebush II, T., Zegarra, J., Ciro, J., Andersen, E.M., Green, M., Pillai, D., Marquino, W., Huilca, M., Arevalo, E., Garcia, C., Solary L., Kain, K. C. (2003). Chloroquine- Rsistyant *Plasmodium vivax* malaria in Perú. Am. J. Trop. Med. Hyg. 69 (5):548-552.
54. Sá, JM, Nomura T., Neves, J., Baird, J.K., Wellles, T.E., del Portillo, HA (2005). *Plasmodium vivax*: allele variants of the *mdr1* gene do not associate with chloroquine resistance among isolates from Brazil, Papúa and monkey6- adapted strains. Exp. Parasitol. 109 (4): 256-259.
55. Sanchez, C. P., Dave, A., Stein, W. D., Lanzer, M.,(2010) Transporters as mediators of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. International Journal for Parasitology. 40: 1109-1118.
56. Schousboe L., Mette, R., Rupika S., Salanti, Ali, Hapuarachchi, H.C., Galappaththy, Gawrie N.L., Bygbjerg, I.C. y colaboradores(2007). Island- wide diversity in single nucleotide polymorphisms of the *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase y dihydripteroate synthetase genes in Sri Lanka. Malaria Journal (6): 28.
57. Snounou G., Viriyakosol S., Jarra W., Thaithong S., Brown K.N. 1993a. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. Mol. Biochem. Parasitol. 58: 283-293.
58. Snounou G., Viriyakosol S., Ping Z.X., Jarra W., Pinheiro L., Do Rosario V. E., Thaithong S., Brown K. N., 1993b. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol. Biochem. Parasitol. 61 (2): 315-320.

59. Snounou, G., B. Singh (2002). "Nested PCR analysis of Plasmodium parasites." *Methods in molecular medicine* **72**: 189-203.
60. Soto, J, Toledo,J., Gutierrez P., Luzz, M., Llinas, N., Cedeño, N., Dunne, M., Berman, J. (2001). Plasmodium vivax clinically resistant to chloroquine in Colombia. *Am. J. of Trop. Med.* 65 (2): 90-93.
61. Staines, H. M., Krishma, S., Barnes, K. I. (2012). Treatment and Prevention of Malaria. Antimalarial drug Chemistry, action and use. Springer. Cap. 1 p.p. 2-9.
62. Sullivan, D. J., Gluzman, I. Y., Russell, D.G., Goldberg, D. E. (1996). One molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. *Proctl. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:11865-11870.
63. Suwanaruk, R., Russel B., Chavchich, M., Chalfein, F., Kenangalem, E., Kosaisavee, V., Prasetyorini y colaboradores (2007). Chloroquine Resistant Plasmodium vivax: In Vitro Characterisation and Association with Molecular Polymorphisms. *Plos One.* 2 (10): e1089.
64. Suwanarusk, R., Chavchich, M., Russell, B., Jidee, A., Chalfein, F., Barends, M., Prasetyorini, B., Kenangalem, E., Piera, K. A., Lek-Uthai, U., Anstey, M., Tjitra, E., Nosten, F., Cheng, Q., Price, R. N. (2008). Amplification of Pvmdr1 Associated with Multidrug Resistant Plasmodium vivax. *The Journal of Infect. Diseas.* 198:1558-64.
65. Wellens, T. (1986). Homologous genes encode two distinct histidine rich- proeins in a cloned isolated of Plasmodium falciparum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 6065-6069.
66. Wide, A, Noya O., Moreno J. (2011). Fundamentos en el Diagnóstico y Control de la Malaria. Cap. 14 p.p. 101-116. Noya, O. y Ossenkopp, John. Diagnóstico Clínico de la Malaria. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Instituto de Medicina Tropical. Universidad Central de Venezuela. Caracas- Venezuela.
67. Wide, A, Noya O., Moreno J. (2011). Fundamentos en el Diagnóstico y Control de la Malaria. Cap. 16 p.p. 125-158. Wide, Albina, Capaldo Jacinta, Pabón Rosalba. Diagnóstico Laboratorio. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Instituto de Medicina Tropical. Universidad Central de Venezuela. Caracas- Venezuela.

ANEXOS

Aval del Comité Ético Científico del IMT-UCV



Oficio CEC-IMT 01/2015

Caracas, 27 de enero de 2015

Ciudadanas
Profa. Albina Wide
Br. Keeyna Urbano Vivas
Sección de Biotecnología
Instituto de Medicina Tropical
Universidad Central de Venezuela
Presente.-

Después de un cordial saludo, nos dirigimos a usted con el fin de informarle que luego de evaluar el proyecto de Tesis de Grado de la estudiante Keeyna Urbano Vivas, como requisito para recibir el título de Licenciada en Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, intitulado: **“Prevalencia del marcador molecular Y976F en el gen PVMDR1 asociado con la farmacoresistencia a *Plasmodium vivax* en el Estado Bolívar”**, hemos decidido otorgarle nuestro **AVAL** para la utilización de las muestras sanguíneas mantenidas en congelación, tomadas a los participantes del proyecto de investigación intitulado “Infecciones asintomáticas y sintomáticas por *Plasmodium vivax*: Evaluación del polimorfismo de los genes de citoquinas y la susceptibilidad a la expresión clínica”, financiado por el FONACIT, identificado con el código 2638, que fue avalado por este Comité según consta en oficio CEC-IMT 12/2013.

Las consideraciones que argumentan esta decisión son las siguientes:

- 1) El estudio planteado tiene pertinencia social, por abordar un aspecto fundamental de una enfermedad como la malaria causada por *Plasmodium vivax*, considerada como un problema de salud pública en Venezuela por su alta morbilidad. A ello se adiciona el problema de la resistencia a las drogas antimaláricas, con el consiguiente resurgimiento y repunte de la enfermedad, así como el efecto del abandono de la farmacovigilancia, asociado al poco conocimiento de la verdadera eficacia de los tratamientos antimaláricos.

En este sentido, el objetivo general de este estudio, cual es la determinación de la prevalencia del marcador molecular Y976F en el gen PVMDR1, constituye un factor relevante, por su posible relación con la resistencia a la cloroquina, principal herramienta terapéutica para la malaria por *P. vivax*. Por esta razón, ello se plantea como una alternativa *in vitro* para evaluar la quimiosensibilidad.

- 2) La investigadora demostró su interés por los aspectos bioéticos de la investigación al incluir un breve apartado para tal fin, lo cual constituye no sólo un ejercicio del buen hacer en la ciencia, sino una práctica que aunque imprescindible, suele estar ausente en la mayoría de los estudios científicos y siempre nos obliga a su exigencia en la versión corregida.



3) Las muestras de sangre a ser utilizadas fueron tomadas tras la aplicación de un consentimiento informado que reúne las condiciones necesarias para cumplir con la normativa bioética nacional e internacional que vela por el respeto a la Dignidad y la Autonomía de los participantes en cuanto a los siguientes aspectos:

- Contiene una introducción o preámbulo que antecede al formulario propiamente dicho de consentimiento informado. Éste fue redactado en lenguaje claro y comprensible, evitando la utilización de lenguaje técnico, con el fin de posibilitar la comprensión de la información y el proceso reflexivo para la toma de una decisión razonada y libre de presiones externas.
- Manifiesta de manera expresa la voluntariedad de la participación del paciente.
- Informa sobre el tipo y duración de la participación del participante.
- Involucra la existencia de un riesgo mínimo para el voluntario(a), así como el beneficio de poder recibir tratamiento antimalárico oportuno, en caso de resultar positivo.
- Expresa la posibilidad del retiro de los participantes sin consecuencias sobre sus derechos como pacientes.
- Asegura la confidencialidad de la información suministrada y de la identidad del paciente.
- Enuncia la posibilidad de divulgación de los resultados obtenidos a partir de las muestras en eventos y publicaciones científicas.
- Manifiesta en forma clara, el destino de las muestras y la posibilidad de ser almacenadas bajo congelación e identificadas con un código, para su uso secundario sólo en futuras investigaciones dentro de la misma línea de trabajo del investigador principal, enmarcada en este caso, en el campo de la utilización de herramientas moleculares en el diagnóstico, tratamiento y control de la malaria.
- Garantiza la gratuidad de las pruebas, así como la no retribución económica de los voluntarios por su participación en el estudio.
- Los datos para poder localizar, en caso de dudas, al investigador responsable u a otros investigadores relacionados con la investigación.
- Concluye con la declaración del voluntario con su firma, cédula y huella, así como la del testigo y del investigador.




UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
"DR. FÉLIX PIFANO"
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO



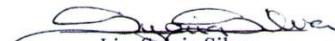

-La elaboración y entrega de una constancia para el voluntario que incluye el nombre del proyecto, la localización física del sitio donde se realiza la investigación y los datos para localizar al investigador responsable en caso de dudas, en señal de respeto por éste.

- 4) En el grupo de muestras que se plantea utilizar, no se incluyen menores de edad ni personas con incompetencia mental, ya que con oportunidad del proyecto original, se restringió la participación de este tipo de personas, por su condición de vulnerabilidad y consiguiente dependencia por parte de otras personas, se indicó al investigador principal, el buen cuidado de la bioética en este aspecto, tan sensible, según el cual sólo se acepta la participación de poblaciones consideradas vulnerables, en caso de que los objetivos de la investigación lo justifiquen plenamente. Para ello es menester demostrar que el estudio no puede realizarse en otro segmento poblacional y que los resultados a ser obtenidos, favorecerán expresamente a esa población en particular.
(ver normas CIOMS y COCEVIN)

Sin otro particular al cual hacer referencia, se despiden de usted:

Atentamente,

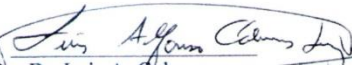
Los miembros del Comité Ético Científico



Lic. Sylvia Silva
(Coordinadora)



Lic. Ivonne Figueira
(Secretaria)



Dr. Alexis Rodríguez A.




Dr. Luis A. Colmenares


Lic. Henry Bermúdez


Abog. Carolina Quiaro


Sr. Carlos Guzmán

Aceptación de Cambio de Título



Oficio CEC-IMT 05/2015

Caracas, 22 de mayo de 2015


Ciudadano
Profa. Albina Wide V.
Sección de Biotecnología
Instituto de Medicina Tropical
Facultad de Medicina U.C.V
Ciudad Universitaria de Caracas
Presente.-

Luego de un cordial saludo nos dirigimos a usted en la ocasión de responder a la correspondencia en la que usted nos informa sobre la leve modificación en el título de su propuesta inicial de investigación "Prevalencia del marcador Y976F en el gen Pvmdr1 asociado con la farmacorresistencia a *Plasmodium vivax* en el Estado Bolívar" al siguiente título: "Detección del Polimorfismo Y967f en el gen Pvmdr1 asociado con la farmacorresistencia de *Plasmodium vivax* en el Estado Bolívar-Venezuela".

En este sentido, nos permitimos comunicarle que el referido cambio de título, el cual interpretamos como una mayor delimitación del objeto de estudio de su investigación, no colide con ninguno de sus aspectos bioéticos, razón por la cual no proponemos que se haga ninguna modificación en este particular. La misma consideración es extensible a la decisión de considerar el objetivo N° 3 como un objetivo opcional.

Aprovechamos esta ocasión para agradecer el hecho de que usted haya informado a nuestro Comité sobre los referidas modificaciones menores en el área metodológica del mencionado trabajo, que si bien no implican cambio alguno en la esfera bioética, de alguna manera refleja la relevancia que para usted y su equipo de trabajo representa la necesaria reflexión en el ámbito ético-científico del quehacer investigativo.




UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
"DR. FÉLIX PIFANO"
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO




Sin otro particular, se despide de usted

Atentamente

Por el Comité Ético Científico



 Lic. Sylvia Silva
 (Coordinadora)

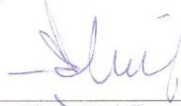

 Lic. Ivonne Pigueira
 (Secretaria)


 Dr. Luis A. Colmenares




 Lic. Henry Bermúdez


 Abog. Carolina Quiaro


 Dr. Alexis Rodríguez


 Sr. Carlos Guzmán

Aval del Comité Ético Científico del IMT-UCV



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
"DR. FÉLIX PIFANO"
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO



Oficio CEC-IMT 12/2013

Caracas, 7 de mayo de 2013

Ciudadana
Profa. Albina Wide
Sección de Biotecnología
Instituto de Medicina Tropical
Universidad Central de Venezuela
Presente.-

Después de un cordial saludo, nos dirigimos a usted con el fin de informarle que luego de analizar el proyecto intitulado: "Infecciones asintomáticas y sintomáticas por *Plasmodium vivax*: Evaluación del polimorfismo de los genes de citoquinas y la susceptibilidad a la expresión clínica" financiado por FONACIT e identificado con el código 2638, hemos decidido otorgarle el **AVÁL** bajo las siguientes consideraciones con fines educativos:

- 1) El estudio planteado tiene pertinencia social, por abordar un aspecto fundamental de una enfermedad como la malaria, considerada un problema de salud pública en Venezuela, cual es la posibilidad de mejorar el diseño de las estrategias de control por medio de la aplicación de técnicas moleculares que permitan definir a las personas asintomáticas y su papel en la transmisión de la infección por *P. vivax*.
- 2) Se nos informó acerca del uso secundario de algunas muestras almacenadas en congelación que habían sido obtenidas con anterioridad con su respectivo Consentimiento Informado, el cual preveía el posible uso de las muestras de sangre sobrantes en investigaciones futuras dentro de la misma línea de investigación
- 3) Se nos informó así mismo, que el resto de las muestras a ser procesadas en esta investigación serían tomadas en una salida de campo planificada con este propósito y se nos anexó el nuevo Consentimiento para nuestra consideración.

- 4) Se realizó la evaluación crítica del mencionado Consentimiento Previa Información, el cual incluyó los aspectos fundamentales exigidos por las normativas bioéticas nacionales e internacionales:

- voluntariedad
- posibilidad de retiro de los participantes sin consecuencias sobre sus derechos como pacientes
- tipo y duración de la participación.
- la existencia de riesgo mínimo por su participación, así como el beneficio de recibir tratamiento oportuno antimalárico en caso de resultar positivo.
- la confidencialidad de la información suministrada y de la identidad del paciente.
- la posibilidad de divulgación de los resultados obtenidos a partir de las muestras en eventos y publicaciones científicas.
- el destino de las muestras y la posibilidad de almacenamiento para su futura utilización sólo en investigaciones relacionadas con el diagnóstico, tratamiento y control de la malaria.
- la gratuidad de las pruebas, así como la no retribución económica por su participación.
- los datos para poder localizar en caso de dudas al investigador responsable u a otros investigadores relacionados con la investigación.
- La declaración del voluntario con la firma, cédula y huella del testigo.
- La declaración del investigador.
- una constancia que debe quedar en las manos del voluntario que incluya el nombre del proyecto, la localización física del sitio donde se realiza la investigación y los datos para localizar al investigador responsable en caso de dudas, en señal de respeto por éste.

- 5) En cuanto a la posibilidad de participación de menores o personas con algún grado de incompetencia mental mediante la firma del representante legal, queremos indicarle que siempre es necesario definir los criterios de inclusión para que quede claramente establecido si se piensan tomar muestras a partir de estas poblaciones u otras consideradas como poblaciones vulnerables. Siendo así, la inclusión de estos grupos poblacionales no se justificaría. Este es un tema muy sensible desde el punto de vista bioético y por ello la participación de este segmento poblacional considerado "vulnerable" sólo se justifica si el estudio en cuestión no pudiera ser realizado con otro grupo poblacional y los resultados a ser obtenidos, favorecieran expresamente a esas personas en particular (ver norma CIOMS y Código de ética para la vida)

- 6) Las modificaciones sugeridas a la Introducción al Consentimiento Informado fueron realizadas, teniendo presente, que el mencionado apartado es un preámbulo que siempre debe anteceder al formulario de Consentimiento propiamente dicho y que en su redacción debe evitarse la utilización de vocabulario técnico. En este sentido debemos enfatizar sobre la necesidad de que este documento que tiene un carácter moral y también legal, debe ser redactado de forma clara y comprensible para que pueda cumplir su labor informativa. Si no

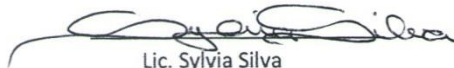
llena estas condiciones se imposibilita el proceso reflexivo por parte del posible participante para la toma de una decisión razonada y libre de presiones externas.

- 7) Saludamos la inclusión aunque breve, de un apartado con los aspectos éticos involucrados. Ello demuestra el interés que el investigador se ha tomado por este aspecto que en la actualidad resulta imprescindible. Sugerimos que en el futuro continúe haciéndolo y amplíe un poco más dicha información.

Sin otro particular al cual hacer referencia, se despiden de usted:

Atentamente,

Los miembros del Comité Ético Científico



Lic. Sylvia Silva
(Coordinadora)



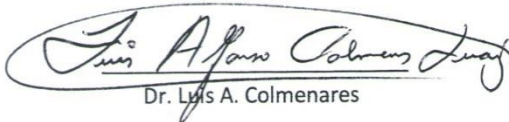
Dr. Alexis Rodríguez



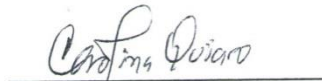
Lic. Ivonne Figueira
(Secretaria)



Dra. Zobeida Uzcátegui



Dr. Luis A. Colmenares



Abog. Carolina Quiaro



Lic. Henry Bermúdez



Sr. Carlos Guzmán

INTRODUCCIÓN AL CONSENTIMIENTO PREVIA INFORMACIÓN

El Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela conjuntamente con el Centro para Estudios sobre Malaria-IAE "Dr. Arnoldo Gabaldon" llevan a cabo el proyecto de investigación: **"Infecciones asintomáticas y sintomáticas por *Plasmodium vivax*: Evaluación del polimorfismo de los genes de citoquinas y la susceptibilidad a la expresión clínica"**

La malaria o paludismo es una enfermedad causada por el parásito *Plasmodium spp* (plasmidios) y transmitida por el zancudo Anopheles. Esta enfermedad se distribuye a nivel mundial, en Venezuela también tenemos malaria principalmente en los estados Bolívar, Amazonas, Sucre, Delta Amacuro, Apure, Anzoátegui, Monagas, Mérida, Táchira, Zulia y Barinas. Sus síntomas son principalmente fiebre, escalofríos, sudoración, dolor de cabeza, dolores en el cuerpo, náuseas y vómitos. Así como existen personas que exhiben síntomas (sintomáticas) existen otras que a pesar de tener parásitos en su sangre, no muestran síntomas, son los llamados portadores asintomáticos. Por lo general, estos casos pasan desapercibidos en los programas de vigilancia, pero pueden jugar un papel importante en la transmisión de la enfermedad por la picadura del insecto trasmisor.

En consecuencia, es necesario prestar mayor atención a los portadores asintomáticos, quienes deben ser identificados. Por ello, nos proponemos hacer una investigación para evaluar la presencia de parásitos en personas con síntomas y sin síntomas, para determinar las defensas o anticuerpos que ellos producen frente a la presencia de esos parásitos y utilizar métodos genéticos para confirmar la infección en ambos grupos. Pensamos que si conocemos quiénes son los portadores asintomáticos a través de todos estos métodos, puede mejorar los programas para controlar la enfermedad. Es por ello, que le estamos invitando a participar voluntariamente en este estudio.

Su participación consistiría, si usted lo autoriza, en extraerle una muestra de sangre (2 tubos de 5ml cada uno, equivalente a dos cucharadas de sangre) y una gota de sangre del lóbulo de la oreja, para realizar estos estudios.

Es importante que sepa que estamos interesados en continuar trabajando en malaria o paludismo, por lo cual deseamos pedirle su autorización para que nos permita guardar la parte sobrante de su muestra para ser utilizada en próximos estudios sobre malaria. La utilización de su muestra en estudios diferentes a los planteados exigiría una nueva autorización por parte suya y la aprobación de un Comité de Bioética que es una organización que vela por el respeto a los derechos y la dignidad de los pacientes

En caso de resultar positivo a la infección por *Plasmodium spp* le será administrado el esquema de tratamiento antimalárico, establecido por el Ministerio del Poder Popular para la Salud, siguiendo los criterios del programa de malaria.



DECLARACION DEL VOLUNTARIO

Luego de haber leído, comprendido y recibido las respuestas a mis preguntas con respecto a este formato de consentimiento del proyecto titulado: **"Infecciones asintomáticas y sintomáticas por Plasmodium vivax: Evaluación del polimorfismo de los genes de citoquinas y la susceptibilidad a la expresión clínica"**

- A. Acepto las condiciones estipuladas en el mismo y a la vez autorizo al equipo de investigadores, a realizar el referido estudio en las muestras que done, a los fines antes indicados.
- B. Reservarme el derecho de revocar esta autorización y donación en cualquier momento, sin que esto conlleve algún tipo de consecuencia negativa para mi persona o mi representado.

En pleno conocimiento de ello, doy mi consentimiento absolutamente voluntario para participar en el estudio.

Nombre y Apellido: _____ C.I.: _____

Firma/huella digital _____

En caso de ser menor de 18 años o presentar alguna condición que afecte su capacidad de decidir:

Nombre del representante legal: _____ C.I. : _____

Firma/huella digital

Testigo 1: _____ C.I. : _____ Firma/huella digital _____

Testigo 2: _____ C.I. : _____ Firma/huella digital _____

INVESTIGADOR(A): _____ FIRMA _____

LUGAR: _____ FECHA: _____

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO PREVIA INFORMACIÓN

Yo, _____ portador de la Cédula de identidad N° _____
con _____ años de edad, mediante la presente declaro:

1. Haber sido informado de manera objetiva, clara y sencilla de todos los aspectos relacionados con mi participación en el proyecto titulado: **“Infecciones asintomáticas y sintomáticas por *Plasmodium vivax*: Evaluación del polimorfismo de los genes de citoquinas y la susceptibilidad a la expresión clínica”**.
2. Comprendo que mi participación en este estudio es voluntaria por lo que puedo retirarme, negarme o interrumpir mi colaboración en cualquier momento, sin perjuicio alguno, ni pérdida de mis derechos.
3. Conozco que mi participación en el trabajo consiste en **donar** una muestra de sangre capilar del lóbulo de la oreja y una muestra de 2 tubos de sangre de 5 ml cada uno, mediante punción venosa a los investigadores del laboratorio de Biotecnología del Instituto de Medicina Tropical-UCV y del Centro para Estudios sobre Malaria-IAE “Dr. Arnoldo Gabaldón” - MPPS. La toma de la muestra no debe acarrear ninguna complicación más allá de un ligero dolor en el sitio de punción, la cual será extraída por un profesional de la salud, previa limpieza del lóbulo de la oreja y la región anterior del antebrazo.
4. Las muestras que suministre serán utilizadas para:
 - Determinar la presencia de parásitos plasmodios en personas sintomáticas y asintomáticas
 - Determinar las defensas (anticuerpos) de cada voluntario frente al parásito
 - Utilizar métodos genéticos para confirmar la infección en ambos grupos.
5. En caso de resultar positivo a la infección por *Plasmodium* spp me será administrado el esquema de tratamiento antimalárico, establecido por el Ministerio del Poder Popular para la Salud, siguiendo los criterios del programa de malaria. Es importante que usted sepa que en algunas personas los medicamentos pueden causar mareos, dolores de cabeza, sudoración, dolores en el cuerpo y fiebre.
6. Acepto que los resultados obtenidos de este estudio, sean divulgados en eventos científicos y/o revistas especializadas.
7. Que el equipo de investigadores me ha garantizado confidencialidad relacionada tanto con mi identidad, como cualquier información a la que tenga acceso por concepto de mi participación en el proyecto antes indicado (muestras serán identificadas con códigos).
8. Que acepto que mi participación en este estudio no implica gasto alguno de mi parte y tampoco recibiré ninguna remuneración económica.
9. Que cualquier pregunta que yo tenga en relación a este estudio, será respondida oportunamente por parte del equipo de investigadores, con quienes me podré comunicar por los teléfonos: 0212-605-35-87, 0212-605-36-46, 0212-605-34-87 (Albina Wide, Jacinta Capaldo, Rosalba Pabón, Oscar Noya), ubicados en el Instituto de Medicina Tropical-UCV y del Centro para Estudios sobre Malaria-IAE “Dr. Arnoldo Gabaldón” MPPS.

Los investigadores responsables de este estudio, desean almacenar y congelar la muestra de sangre restante luego de realizar las pruebas anteriores, para que pasen a formar parte del Banco de sueros del Laboratorio del Centro para Estudios sobre Malaria. Las mismas podrían ser utilizadas en futuras investigaciones enfocadas a mejorar las pruebas de diagnóstico de malaria y justificar la terapéutica. Esto se hará SOLO SI USTED ESTA DE ACUERDO, para ello: Marque a continuación con una “X”

¿Autoriza a conservar por congelamiento la muestra (glóbulos rojos, suero/plasma) restante en lugar de descartarla?

SI ___ NO ___

Si la respuesta anterior es afirmativa, ¿Usted está de acuerdo en permitirnos localizarlo para obtener mayor información?

SI ___ NO ___

Usted puede cambiar de opinión con respecto a ser contactado nuevamente para suministrar información, cuando así lo desee. Asimismo, puede cambiar de opinión en permitir que sus muestras sean utilizadas en investigaciones futuras. Si fuese el caso contacte al investigador responsable y hágale saber su **decisión**, en cuyo caso sus muestras no serán utilizadas para estudios adicionales.

Cualquier investigación ulterior que se realice usando sus muestras será revisada por el Comité de Ética, una comisión que vigila la investigación médica para proteger los derechos y bienestar de los voluntarios.

CONSTANCIA PARA EL PACIENTE Y/ O PARTICIPANTE

Yo, _____ Cédula de identidad N° _____

declaro que he sido informado sobre el proyecto intitulado: "**Infecciones asintomáticas y sintomáticas por *Plasmodium vivax*: Evaluación del polimorfismo de los genes de citoquinas y la susceptibilidad a la expresión clínica**" y he consentido participar voluntariamente en el mismo. Podré acudir al equipo responsable ante cualquier duda relacionada a mi participación en este estudio, con quienes me comunicaré por los teléfonos: 0212-605-35-87, 0212-605-36-46, 0212-605-34-87 (Albina Wide, Jacinta Capaldo, Rosalba Pabón, Oscar Noya) del Instituto de Medicina Tropical-UCV y Centro para Estudios sobre Malaria-IAE "Dr- Arnoldo Gabaldon", MPPS. Ciudad Universitaria. Fecha: _____

✂ -----

CONSTANCIA PARA EL PACIENTE Y/ O PARTICIPANTE

Yo, _____ Cédula de identidad N° _____

declaro que he sido informado sobre el proyecto intitulado: "**Infecciones asintomáticas y sintomáticas por *Plasmodium vivax*: Evaluación del polimorfismo de los genes de citoquinas y la susceptibilidad a la expresión clínica**" y he consentido participar voluntariamente en el mismo. Podré acudir al equipo responsable ante cualquier duda relacionada a mi participación en este estudio, con quienes me comunicaré por los teléfonos: 0212-605-35-87, 0212-605-36-46, 0212-605-34-87 (Albina Wide, Jacinta Capaldo, Rosalba Pabón, Oscar Noya) del Instituto de Medicina Tropical-UCV y Centro para Estudios sobre Malaria-IAE "Dr- Arnoldo Gabaldon", MPPS. Ciudad Universitaria. Fecha: _____

✂ -----

CONSTANCIA PARA EL PACIENTE Y/ O PARTICIPANTE

Yo, _____ Cédula de identidad N° _____

declaro que he sido informado sobre el proyecto intitulado: "**Infecciones asintomáticas y sintomáticas por *Plasmodium vivax*: Evaluación del polimorfismo de los genes de citoquinas y la susceptibilidad a la expresión clínica**" y he consentido participar voluntariamente en el mismo. Podré acudir al equipo responsable ante cualquier duda relacionada a mi participación en este estudio, con quienes me comunicaré por los teléfonos: 0212-605-35-87, 0212-605-36-46, 0212-605-34-87 (Albina Wide, Jacinta Capaldo, Rosalba Pabón, Oscar Noya) del Instituto de Medicina Tropical-UCV y Centro para Estudios sobre Malaria-IAE "Dr- Arnoldo Gabaldon", MPPS. Ciudad Universitaria. Fecha: _____

✂ -----

CONSTANCIA PARA EL PACIENTE Y/ O PARTICIPANTE

Yo, _____ Cédula de identidad N° _____

declaro que he sido informado sobre el proyecto intitulado: "**Infecciones asintomáticas y sintomáticas por *Plasmodium vivax*: Evaluación del polimorfismo de los genes de citoquinas y la susceptibilidad a la expresión clínica**" y he consentido participar voluntariamente en el mismo. Podré acudir al equipo responsable ante cualquier duda relacionada a mi participación en este estudio, con quienes me comunicaré por los teléfonos: 0212-605-35-87, 0212-605-36-46, 0212-605-34-87 (Albina Wide, Jacinta Capaldo, Rosalba Pabón, Oscar Noya) del Instituto de Medicina Tropical-UCV y Centro para Estudios sobre Malaria-IAE "Dr- Arnoldo Gabaldon", MPPS. Ciudad Universitaria. Fecha: _____