

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POST GRADO

Genotipia de *Plasmodium Vivax* y su importancia en el manejo y control de la malaria de la amazonía peruana

TESIS Para optar el grado de DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

AUTOR

Maritza Mercedes Calderón Sánchez

ASESOR Juana María Cocha Gonzales

LIMA – PERÚ 2006

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| AGRADECIMIENTOS . | 1 |
| .. | 3 |
| RESUMEN . | 5 |
| ABSTRACT . | 7 |
| INTRODUCCIÓN . | 9 |
| 1.1 Importancia . | 10 |
| ANTECEDENTES . | 13 |
| 2.1 Generalidades: . | 13 |
| 2.2 Ciclo de vida: . . | 14 |
| 2.3 .Diagnóstico de la malaria: . . | 15 |
| 2.4. Trabajos previos realizados: . . | 15 |
| 2.5. Relación entre la Organización genómica de <i>Plasmodium vivax</i> y el control de la malaria. . . | 18 |
| OBJETIVOS . . | 21 |
| MATERIALES Y MÉTODOS . | 23 |
| A POBLACION DE ESTUDIO: . . | 23 |
| B MÉTODOS: . . | 24 |
| 4.1. Gota gruesa y frotis: . . | 24 |
| 4.2. Extracción de ADN . | 24 |
| 4.3. Nested PCR . . | 24 |
| 4.5. Proteína de Superficie del Merozoito (MSP3 alfa) . | 26 |
| 4.6. Visualización de los productos del PCR . | 26 |
| 4.7. Características de los “primers” . . | 27 |
| 4.8. Análisis de datos . | 27 |
| RESULTADOS . . | 29 |
| 5.1. Control de calidad del Nested-PCR . | 29 |
| 5.2. Diversidad de genotipos con TR. . . | 29 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.3. Diversidad de Genotipos con MSP3 alfa. . | 30 |
| 5.4. Severidad de la enfermedad y su relación con el genotipo del Parásito . | 31 |
| DISCUSIÓN . | 33 |
| 6.1. Utilización del PCR en el control de calidad. . | 33 |
| 6.2. Diversidad de genotipos en la población muestreada. . | 34 |
| 6.3. Relación de genotipos con la severidad de la enfermedad. . | 36 |
| 6.4. La genotipificación en el control y manejo de la malaria. . | 37 |
| CONCLUSIONES . . | 41 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS . | 43 |
| ANEXOS . | 51 |

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Juana Cocha, Dr. Robert Gilman, Dr. Joe Vinetz, por toda la ayuda brindada y sobre todo por la confianza que en todo momento me demostraron.

A la Dra. Margaret Kosek, Dr. Pablo Peñataro, Dr. César Munayco, Dr. Raúl Chuquillauri, Dr. Eddy Segura por el apoyo brindado en el proceso de recolección de muestras.

Al Dr. Mirko Zimic, Dr. César Carcamo, Dr. Willy Lescano, Dra. Patricia Sheen, Dra. Rina Ramírez y el MSc. Jaeson Calla por haber compartido conmigo sus conocimientos, sin los cuales hubiera sido difícil concluir el presente trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de Enfermedades infecciosas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia en especial al MSc. César Jeri, Blga. Viviana Pinedo, por su valiosa colaboración en la culminación del presente trabajo.

Mi agradecimiento profundo a mis familiares, colegas y amigos que colaboraron de una u otra forma en el desarrollo de este trabajo.

A Dios, quién siempre me acompaña A la memoria de mi madre: Juanita a quien dedico este trabajo. A mi padre Manuel y mis hermanos: Luis, Percy, Manuel y Carmen, por apoyarme y alentarme en todo momento A mi esposo Juan por su amor, su ayuda y sobre todo la paciencia que en todo momento me demuestra.

RESUMEN

Los genotipos de *Plasmodium vivax*, junto con la densidad parasitaria pueden estar relacionados al grado de severidad de la malaria. El conocimiento de esta relación puede ayudar a un mejor manejo de la enfermedad, tratamiento con drogas y elaboración de posibles vacunas. El objetivo del trabajo fue determinar el número de genotipos de *Plasmodium vivax* presentes en la Amazonía Peruana. Para la genotipificación se usó el gen que codifica la proteína de superficie del merozoito (MSP3 alfa) y el polimorfismo generado por secuencias repetitivas de nucleótidos (TR) encontrado en un segmento de 100 Kilobases (Kb) de *Plasmodium vivax* "sintético" al cromosoma 3 de *Plasmodium falciparum*. Se trabajó con 302 muestras de sangre de pacientes, a todas ellas se les realizó el examen de la gota gruesa y frotis para el diagnóstico y conocimiento de la densidad parasitaria, dicho diagnóstico fue confirmado por Nested PCR. A las muestras confirmadas se les realizó la genotipificación. Con el marcador MSP3 alfa se identificaron 9 genotipos, de los cuales uno de ellos se encontró asociado a severidad de la enfermedad (P7) ($P < 0.05$, $OR > 1$), y otro relacionado con infecciones mixtas (P9), 1/9 (11%). Para los TR se seleccionaron 9 pares de "primers" de un total de 33. Encontrándose 102 genotipos diferentes de los cuales 24/102 (24%) fueron infecciones por genotipos mixtos. El hecho que exista una inserción en el tamaño de su ADN originalmente reportado, aumenta la posibilidad que se dé la enfermedad en forma más severa. Estos resultados indicarían que poblaciones de *Plasmodium vivax* son altamente diversos y que infecciones por múltiples clonas se darían en la región hipoendémica de la Amazonía Peruana, las cuales podrían representar un desafío para evaluación posterior de drogas y vacunas.

ABSTRACT

Genotypes of *Plasmodium vivax* along with parasite density may be associated with the severity level of malaria, and knowledge of this relation can help to better understand the disease, drug treatments and the development of new vaccines. The object of this project was to determine the number of *Plasmodium vivax* genotypes present in the Peruvian Amazon. This genotyping utilized the gene encoding a merozoite surface protein (MSP3 alpha) and the polymorphism generated by a sequence of nucleotide repeats (TR) found in a 100 kilobases (Kb) de *Plasmodium vivax* syntenic chromosome 3 of *Plasmodium falciparum*. In this project we used 302 blood samples from patients. A blood droplet and droplet smear were obtained for the diagnostic and observation of parasite density; these results were later confirmed through Nested PCR. All samples were submitted for genotyping. Using the marker MSP3 alpha, 9 genotypes were identified, one was found associated with disease severity (P7) ($P < 0.05$, $OR > 1$) and other with mixed infections (P9) 1/9 (11%). For the TR, 9 pairs of primers were selected from a pool of 33 describing 102 different genotypes of which 24 (24 %) were mixed infections. Observation supported by the existence of a DNA insertion that increases the original size of the sequence, increasing the possibility that the disease become more severe. These results would indicate that populations of *Plasmodium vivax* are highly diverse and can result in multiple infections by different clones in hypoendemic regions such as the Peruvian Amazon, making later evaluation of drugs and vaccines more challenging.

INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad producida por un protozoo del género *Plasmodium*. Existen cuatro especies reportadas: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* y *P. ovale*. La enfermedad se transmite por la picadura de zancudos hembras del género *Anopheles*, los cuales actúan como vectores. De las cuatro especies de malaria conocidas que infectan al humano, *Plasmodium vivax* es el que ha alcanzado una mayor distribución mundial y es el responsable de más del 50% de casos de malaria en América central, Sudamérica y el Subcontinente de la India (Vargas y col. 2003).

La malaria es un problema importante y continuo en salud pública en nuestro país. En Loreto, un departamento situado al noreste de la Amazonía Peruana, la transmisión de la malaria ocurre en un rango de 4,000 a 10,000 casos anuales y con tendencia a seguir aumentando. La malaria causada por *P. vivax*, es la forma más común en la región Amazónica de Iquitos y es importante causa de alta morbilidad y de pérdidas económicas en nuestro país, así como alrededor del mundo. Cientos de millones de personas están en riesgo de adquirir esta enfermedad con cerca de 75 millones de casos reportados anualmente (Carlton 2003; Roshanravan y col. 2003; Parekh y col. 2005; Sumawinata y col.2005; Vittor y col. 2005).

La epidemiología de la malaria es el resultado de la interacción entre el parásito, el vector y el hospedero, la cual varía considerablemente en diferentes poblaciones geográficas (Kain y col. 1993; Myrick y col. 2005). Poco se conoce acerca de la estructura genética de *P. vivax* que causa una malaria debilitante y de alta prevalencia en humanos. En el ciclo de vida de *P. vivax*, las recaídas son un aspecto importante, éstas

son originadas por el estadio durmiente de los esporozoitos llamado hipnozoito, las recaídas pueden ocurrir semanas o años después que se ha dado el primer episodio de la parasitemia y la enfermedad clínica. La primaquina es una droga que mata al parásito que en el hígado se encuentra en este estadio (Vargas y col. 2003; Baird y col. 2004).

La habilidad de este parásito de completar su ciclo esporogónico a una temperatura mínima de 16°C comparada con 21°C utilizado por *P. falciparum* ha contribuido sustancialmente a la capacidad de establecerse en distintas zonas (Ousmane y col. 2005).

Históricamente, la malaria por *P. vivax* o terciana benigna ha sido reportada años atrás en regiones templadas de EE. UU. y en el sur de Inglaterra (Duarte y col. 2004), casos esporádicos en estas regiones todavía ocurren hoy en día. A pesar de su amplia prevalencia, estudios concernientes a la biología del parásito y a las manifestaciones de la enfermedad han sido limitados en parte debido a que la mayor atención ha sido dirigida a *P. falciparum*, por ser el causante de la malaria maligna (Ayala y col. 2005; Certain y col. 2005; Sa y col. 2005; Volman y col. 2005). Los trabajos realizados con *P. falciparum* han demostrado que la población parásita es bastante heterogénea tanto en regiones hiperendémicas como hipoendémicas donde la transmisión de la malaria es estacional (Felger y col. 1999; Viriyakosol y col. 1999; Bharti y col. 2005; Imwong y col. 2005).

La diversidad parasitaria es comúnmente observada dentro de un área endémica, donde diferentes cepas del parásito circulan en un hospedero humano (Mendizabal-Cabrera y col. 2005). Distinguir entre las diferentes poblaciones es un prerequisite para entender la local y global epidemiología de una especie de parásito (Imwong y col. 2005). Información de la diversidad genética en la población de *P. vivax*, nos va a permitir conocer secuencias específicas de especie, las cuales pueden ser utilizadas para interferir su ciclo biológico, todos estos alcances serán de mucha ayuda no sólo para biólogos o genetistas sino que serán de gran importancia para desarrollar estrategias y medidas de control de la enfermedad, así como, en elaborar vacunas basadas en antígenos altamente polimórficos (Brown y col. 1992; Cui y col. 2003a; Hanna y col. 2004; Ceravolo y col. 2005) .

1.1 Importancia

Hasta mediados del siglo XX, *Plasmodium vivax* mostró la más amplia distribución de las cuatro especies de parásitos causantes de la malaria, reportados en humanos (Oficina Sanitaria Panamericana 1993; Bruce y col. 1999; González y col. 2001). En el Perú, la ciudad de Iquitos, capital del Departamento de Loreto, es considerada una zona endémica de malaria, tiene una población de 345,000 habitantes formando un gran centro urbano, la cual es accesible por vía aérea y fluvial. En los pueblos y las villas de los alrededores de Loreto la población rural es de 474,000 habitantes, su economía está basada en la agricultura, la pesca, actividades comerciales y el petróleo, a pesar de todos los esfuerzos que se han hecho en el área de salud, Iquitos continúa siendo endémica para Malaria (Sawyer 1993).

La campaña de erradicación de la malaria por la Organización Mundial de la Salud realizada a mitad de 1950 fue más exitosa en regiones de Europa, Asia y América dando como resultado la erradicación temporal de la enfermedad. Sin embargo, posteriormente se vio incrementada (Madhusudhan y col. 2005). Paralelo a la epidemia de malaria ha habido un incremento de su vector altamente competitivo y antropofílico *Anopheles darlingi*, considerado como el vector más significativo en América del Sur, capaz de transmitir *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*. *A. darlingi* no fue encontrado en el área de Iquitos en el año 1967, tampoco se reportó en el periodo 1988-1991, aparentemente la presencia de este zancudo se inició y estableció en esta región en 1993, conjuntamente con el primer reporte de casos de *P. falciparum* en el área periurbana de la ciudad (Aramburu y col. 1999). Además, diversas actividades antropogénicas que provocan deforestación en las zonas tropicales tales como la construcción de carreteras, desarrollo agrícola, embalses, piscigranjas, entre otras, desencadenan cambios en la ecología, por consiguiente pueden originar diversidad en los vectores de enfermedades (Laurenco y col. 1989).

La diversidad genética del parásito podría estar influenciando significativamente en el flujo de genes (Bray y col. 2005; Mehlotra 2005 y col.; Salas y col. 2005). Grandes avances se han realizado en este campo en las 2 últimas décadas sobre todo en el conocimiento de la diversidad genética de *P. falciparum*. Sin embargo, la diversidad genética de *P. vivax* ha sido menos estudiada (Mc Cutchan y col. 1984; Fryauf y col. 2005).

La importancia de realizar un diagnóstico preciso para esta enfermedad reside más en determinar la especie de *Plasmodium* que causa la enfermedad, a fin de que el paciente reciba el adecuado tratamiento. Hace 50 años la droga de elección para el tratamiento de *Plasmodium vivax* fue la Cloroquina, fármaco usado debido a su bajo costo y alta efectividad. Actualmente, en nuestro país no se dispone de información sobre resistencia de *P. vivax* a esta droga (Trenton y col. 2003)

La existencia de algunos reportes de resistencia a la cloroquina en países sudamericanos, Asiáticos, Africanos podría deberse a que, la diversidad genética de *P. vivax* tiende a variar según el área geográfica y el vector, siendo este último, al igual que el humano, los únicos reservorios de *Plasmodium* (Aubouy y col. 2003; Trenton y col. 2003; Brega y col. 2004; Miller y col. 2004; Coldren 2005b y col.; Fernandez y col. 2005)

Es necesario realizar mayores objetivos principales del presente trabajo. Estos conocimientos posteriormente podrían ser de utilidad para el estudio de la biología y diversidad genética del parásito, ser de utilidad para el tratamiento con drogas y el diseño de vacunas efectivas, las cuales estarían dirigidas a una o varias de las fases del ciclo del parásito: fase preeritrocítica, hepática, asexual y sexual.

ANTECEDENTES

2.1 Generalidades:

La malaria es una enfermedad transmitida por un parásito del Reino protista, Filo Sporozoa, Clase Esporozoea, Subclase Coccidea, Orden Haemosporidea, Familia Plasmodidae y Género *Plasmodium*, del que se conocen más de 85 especies.

Para Humanos hay cuatro especies de *Plasmodium* que provocan la malaria o paludismo: *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. falciparum*, de las cuales sólo la última es realmente una amenaza para la vida (Carlton 2003; Parekh y col. 2005)

En el ciclo del *Plasmodium* existen dos huéspedes, uno definitivo (la hembra del mosquito *Anopheles*, donde el *Plasmodium* se reproduce sexualmente) y otro intermediario (el ser humano, donde se realiza la reproducción asexual del parásito) (Manguin y col. 1995). Aunque se conocía que el mosquito *Anopheles* cumple un papel importante en la transmisión de la enfermedad de la malaria no fue sino hasta 1948 cuando se identificaron todas las etapas de su ciclo vital (Aramburu y col. 1999).

La malaria, es una antigua enfermedad. Se piensa que el hombre prehistórico debió haber sufrido de malaria. Probablemente se originó en Africa y por migración de poblaciones se distribuyó a las orillas del Mediterráneo, a la India y al Asia Sur-Oriental. En el pasado la malaria era común en las áreas pantanosas de Roma y por ende su

nombre se deriva del italiano, (mal-aria) o “mal aire”, también se conocía como fiebre romana. Los síntomas más comunes, además de la fiebre y los escalofríos son: dolor de cabeza, dolores musculares (mialgia), dolores articulares (artralgia), malestar general, dolor de cabeza, marcado decaimiento y trastornos digestivos (nauseas, vómitos y diarrea). Estos síntomas pueden ser fácilmente confundidos con gripe, gastroenteritis o, inclusive fiebre tifoidea, fiebre reumática o meningitis bacteriana. También pueden presentarse signos de esplenomegalia, anemia con o sin trombocitopenia, hipoglucemia, disfunción renal o pulmonar y alteraciones neurológicas. Todos los signos y síntomas varían en función de la especie de *Plasmodium*, densidad parasitaria y el estado inmune del paciente (Barry 2005)

En la actualidad, unos 500 millones de personas están expuestas a la malaria endémica en África, India, Asia Sur-Oriental y América del Sur y se estima que actualmente causa dos y medio millones de muertes, siendo los niños los mayormente afectados (Cui y col.2003a).

2.2 Ciclo de vida:

El ciclo de vida de los *Plasmodium* se inicia con la transmisión a los humanos por la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles* (ciclo sexual o esporogónico) con una duración de 8 - 16 días. Este ciclo se inicia cuando los gametocitos macho y hembra al ser ingeridos por el mosquito maduran a gametos y dan lugar al cigoto que se introduce en el epitelio intestinal del insecto, para obtener miles de esporozoitos que migran a las glándulas salivales que serán inoculados por el mosquito en el torrente sanguíneo del hombre, iniciándose el ciclo asexual o esquizogónico del parásito. En este ciclo se observan dos fases:

a) La Fase Exoeritrocítica: Los esporozoitos pasan de la circulación a las células hepáticas para realizar el ciclo Esquizogónico donde se obtienen los merozoitos que al quedar libres inician éstas fases nuevamente. Esta fase tiene una duración de 6 a 8 días y termina cuando los merozoitos invaden los hematíes, iniciándose:

b) La Fase Eritrocítica: Los merozoitos, al invadir los glóbulos rojos dan lugar al estadio de trofozoito joven, luego adulto, seguido del esquizonte. Éste origina nuevamente merozoitos que al romper el hematíe repiten el ciclo dependiendo de la especie; luego de 2 ó 3 generaciones, algunos merozoitos desarrollan los gametocitos que son la forma infectante para el mosquito. En *P. vivax*, *P. ovale* y probablemente el *P. malariae* se pueden observar todas las etapas de desarrollo posteriores al ciclo hepático en la sangre periférica. Mientras que en *P. falciparum* generalmente sólo se observan formas de anillo y gametocitos en sangre periférica. Las formas en desarrollo aparentemente se pegan de los vasos sanguíneos de órganos grandes, como el cerebro, y restringen el flujo sanguíneo con consecuencias graves (Figura 1).

Las cuatro especies de *Plasmodium* tienen un componente hemolítico, cada vez que una generación de merozoitos destruye el glóbulo rojo, se generan los síntomas. En el

caso, de *P. falciparum*, los parásitos se multiplican rápidamente y pueden infectar más del 30% de los eritrocitos causando un nivel muy significativo de hemólisis. Una posible razón es el hecho de que el *P. falciparum* invade células rojas de todas las edades, mientras que *P. vivax* y el *P. ovale* prefieren células rojas jóvenes y el *P. malariae* busca células rojas maduras (Carlton 2003).

2.3 .Diagnóstico de la malaria:

El diagnóstico del laboratorio se realiza con un examen de sangre periférica, mediante frotis y gota gruesa. La toma de muestra se realiza mediante la punción con una lanceta estéril, normalmente en la yema del dedo. Se recoge una gota de sangre en un portaobjetos y con otro se realiza la extensión en capa fina. Para la gota gruesa se recogen 3 ó 4 gotas sobre un portaobjetos y con la esquina de otro se unen en movimientos rápidos, extendiéndose en una capa gruesa y uniforme. La gota gruesa permite analizar una mayor cantidad de sangre, facilitando la detección de parasitemias bajas y un ahorro de tiempo en el examen. La extensión en capa fina nos permite identificar la especie de parásito existente en la muestra. Son muchas las tinciones de sangre periférica que se aplican para el diagnóstico del paludismo, desde las convencionales de Giemsa, May-Grünwald-Giemsa, Field y Leishman hasta las fluorescentes con naranja de acridina o el sistema QBC (Ministerio de Salud 1994; Solari y col. 2002).

Existen técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite la detección del DNA genómico de las cuatro especies parasitarias. La amplificación por PCR es posible incluso con 3-4 parásitos/μl. Al ser una técnica bastante sensible, permite detectar parasitemias bajas, infecciones mixtas, e incluso pacientes asintomáticos, de tal modo que permite iniciar rápidamente el correcto tratamiento. Podría ser la técnica de referencia por su alta sensibilidad y especificidad pero, aparte de no estar comercializada, no está al alcance de todos los laboratorios y no se adapta al diagnóstico de urgencia individualizado (Singh y col.1996).

Las técnicas serológicas, para detección de anticuerpos anti *Plasmodium* en el suero de los pacientes, tienen baja sensibilidad para el diagnóstico de malaria. Se utiliza en determinados casos en los que la microscopía es negativa por la toma de medicación, o en los bancos de sangre. La técnica habitual es una inmunofluorescencia y la técnica de ELISA (Enzyme Linked Inmunosorbent Assay) (Kain y col. 1992b; Parekh y col. 2005).

2.4. Trabajos previos realizados:

Robert Koch, en 1905 estudió comunidades de la Costa Norte de Papua Nueva Guinea infectadas con Malaria, él reportó que los niños adquirían más la enfermedad, mientras que los adultos desarrollaban inmunidad que los protegía frente a esta, pero no frente a la

infección. Esta característica de inmunidad adquirida dependiente de la edad ha sido un patrón estándar en la epidemiología de la malaria (Coldren 2005a).

La epidemiología molecular empezó años atrás en 1970, con el trabajo de Carter, Mc Gregor y Voller, usando isoenzimas para tipificar *Plasmodium*. Estas investigaciones al igual que otras, han permitido descubrir muchas características importantes concernientes a infecciones del hombre por este parásito, las cuales han sido largamente confirmados por subsecuentes estudios moleculares epidemiológicos utilizando ya sea anticuerpos monoclonales o la técnica ampliamente usada de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Contamin y col.1995; Singh y col.1996).

Numerosos marcadores como Microsatélites, Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y Polimorfismo por un simple nucleótido (SNP) han sido usados en estudios con *P. falciparum* (Kain y col.1992a; Hanna y col. 2004; Katsnelson y col.2005). Pocos marcadores ortólogos de genes identificados para *P. falciparum* han sido usados para estudios de población de *P. vivax* (Brookes 1999; Ayala y col.2005). En nuestro país, se han desarrollado estudios de la diversidad genética de *Plasmodium falciparum* en 46 pacientes con malaria grave complicada (MGC) y 30 con malaria no complicada (MNC) circulante en un área del departamento de Loreto, para lo cual se utilizó el gen que codifica la proteína rica en glutamato (GLURP). Cuatro genotipos fueron detectados en los pacientes con MGC y ocho genotipos en pacientes con MNC. Asimismo, en el 50% de las muestras con MNC detectaron infecciones múltiples, a diferencia de las muestras de MGC en donde no detectaron este tipo de infecciones. Con ello concluyeron que existe diversidad genética en esta región, lo que ayudaría a llevar a cabo estudios epidemiológicos posteriores (Hijar y col. 2002). Ayala y col. también realizaron en 1999 la tipificación de cepas de *P. falciparum* usando MSP1, MSP2 y la proteína rica en glutamato con la finalidad de distinguir parásitos infectantes de los que no lo son, concluyendo que la genotipificación del parásito de la malaria será útil para distinguir fallas en el tratamiento clínico con drogas antimaláricas. Numerosas investigaciones realizadas en poblaciones con diferente grado de transmisión de malaria han demostrado la relación existente entre la estructura de la población de *P. falciparum* y la epidemiología de la enfermedad. La diversidad genética le confiere a *P. falciparum* la capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero y producir variantes resistentes a medicamentos y a vacunas, aspectos que juegan un papel importante en el establecimiento de medidas de control de la malaria (Ayala y col. 2005). También se menciona que existen eventos de recombinación genética del parásito realizados durante su ciclo de vida los cuales dan lugar a su diversidad genética (Laurenco y col. 1989; Rajasekhar 2005; Sa y col.2005). La carencia de marcadores genéticos para *P. vivax* ha impedido hacer un análisis de estructura poblacional e historia evolutiva del parásito así como hacer un mapa de su fenotipo que contribuya al conocimiento de resistencia a drogas antimaláricas y patrones involucrados en casos de recidivas (Coldren 2005b) .

La importancia de *P. vivax* en la salud pública ha motivado que diferentes investigaciones se efectúen con la finalidad de un mejor entendimiento de esta parasitosis, como la realizada en zonas hipoendémicas de la Amazonía de Brasil, donde encontraron que la incidencia de *P. vivax* era 4 veces mayor que la de *P. falciparum*; no encontraron como factores de riesgo ninguno relacionado con la edad ni ocupación, pero

sí con transmisión intra y peri domiciliaria por el vector local (Duarte y col. 2004). En otros estudios realizados en Papua Nueva Guinea, Indonesia y Guyana se han utilizado "primers" específicos para el diagnóstico de *Plasmodium* en humanos, los cuales no amplificaron ADN de otros *Plasmodium* presentes en primates, por lo cual fueron de gran ayuda en estudios de polimorfismo de este parásito (Gómez y col. 2003).

Estudios posteriores en *Plasmodium vivax*, demuestran que la proteína del Circunsporozoito (CSP) y la Proteína de Superficie del Merozoito (MSP1), son excelentes marcadores moleculares, los cuales han sido utilizados para tipificar cepas provenientes de Tailandia, Guatemala, Brasil. Estos trabajos ayudaron a relacionar los tipos genéticos del parásito con su asociación con factores epidemiológicos, así como la relación filogenética entre las variantes identificadas, que permitió predecir el flujo de estos genes (Imwong y col. 2005; Mendizabal-Cabrera y col. 2005; Putaporntip y col. 2005). Recientes investigaciones en *Plasmodium vivax*, consideran a la proteína MSP1 como candidata para la elaboración de vacunas, debido a que presenta gran polimorfismo antigénico entre poblaciones de parásitos generada por recombinación durante la reproducción sexual del mosquito vector (Figtree y col. 2000). Otros investigadores mencionan que en la proteína MSP1 hay alto grado de polimorfismo y este parece depender de la endemicidad de la malaria y a su vez es mantenido por selección positiva (Santos-Cimera 2005).

A la fecha se han reportado 2 variedades utilizando el marcador CSP, el VK210 y el VK247, siendo el más abundante el primero, esta diversidad se debe, según los investigadores, a la selección generada durante la infección en humanos. (Leclerc y col. 2005).

La Proteína de Superficie del Merozoito 3 alfa (MSP3 alfa) y la proteína AMA1 (Antígeno Apical del Merozoito), también son utilizadas en estudios de genotipificación de *P. vivax*; la primera proteína tiene un dominio rico en alanina y su tamaño es variado debido a presencia de inserciones y deleciones que ocurren en ella. Con respecto a la proteína AMA1, mediante secuenciamiento se ha detectado en su genoma presencia de SNPs (Polimorfismo de un solo nucleótido) originados por deleciones o repetidas inserciones (Rayner y col. 2004; Gunasekera y col 2005).

En el presente año ya se ha publicado una posible vacuna elaborada a partir de la proteína MSP3 alfa, la cual se está evaluando en Francia en voluntarios humanos (). Para la elaboración de vacunas se necesita conocer más acerca de la diversidad genética del parásito, lo cual en la práctica significa secuenciamiento de un gran número de genotipos provenientes de muestras representativas de la población local infectada. También se necesita conocer la consecuencia de la diversidad genética para el sistema inmune, debido a que la variabilidad en el polimorfismo de *Plasmodium vivax*, hará que el sistema inmune se enfrente frecuentemente a combinaciones antigénicas. Si se considera esto, la posible vacuna que se elabore tendrá que ser multigénica y multiestado sabiendo que *Plasmodium* atraviesa en todo su ciclo de vida por varios estadios bastante complejos, expresándose en cada uno de ellos diferentes antígenos (Oficina Sanitaria Panamericana 1993; Ousmane y col. 2005).

La baja adquisición de inmunidad para malaria se cree que es una consecuencia de la exposición a un rango de parásitos de diversa variabilidad antigénica en una

determinada población endémica. La habilidad para describir la diversidad genética en términos de polimorfismo de un nucleótido en el genoma de *Plasmodium* permite al investigador entender el rol de la diversidad antigénica en la patogénesis y transmisión de la malaria (Barry 2005).

Marcadores de Microsatélites, de RFLP y de SNP han sido usados en estudios de *P. falciparum*. También un pequeño grupo de marcadores ortólogos previamente identificados de los genes antigénicos de *P. falciparum* han sido usados para estudios de poblaciones de *P. vivax*, esto debido a que ambas especies de parásitos surgieron de un ancestro común por especiación (Carlton 2003). Genotipificar *P. vivax* usando Microsatélites, no es muy recomendable, debido a que la frecuencia de éstos en el parásito parece ser mucho menor que las presentadas en *P. falciparum*.

Mediante pruebas inmunológicas tales como ELISA se han detectado anticuerpos contra *Plasmodium* en poblaciones endémicas con diferentes niveles de transmisión, para esto se ha utilizado la proteína Duffy (DBP) y la MSP1; algunos investigadores reportan que la primera proteína es naturalmente inmunogénica y que la proporción de IgG frente a ella se incrementa con la exposición a la enfermedad (Ceravolo y col. 2005). Otros alcances mencionan que la respuesta de anticuerpos IgG e IgM frente a MSP1 tiene relación con la gravedad, edad e infecciones subclínicas en mujeres embarazadas en la región de Iquitos-Perú, y que podría tener un importante efecto en el infante (Parekh y col. 2005).

En la Región Loreto se registraron en 1995 un total de 33,157 casos de Malaria. La ciudad de Iquitos se vio afectada en forma significativa desde ese año, produciéndose un incremento de la demanda de atención para esta enfermedad, las que se hicieron efectivas a través de la realización de campañas de “barrido hemático y bloqueo farmacológico”, en zonas periurbanas de la ciudad.

Trabajos respecto a la profilaxia y tratamiento de malaria por *P. vivax* también han sido realizados encontrándose que la inoperancia de la profilaxia por mefloquina puede conducir a probables casos de resistencia a cloroquina, fármaco actualmente administrado por el Ministerio de salud de nuestro país, conjuntamente con Primaquina (contra los hipnozoitos). El análisis de la secuencia del genoma de 10 aislamientos de cepas resistentes a cloroquina reportaron que el 70% es similar a proteínas que codifican resistencia a múltiples drogas (MDR) de otros *Plasmodium* (Hastings y col. 2005; Picot y col. 2005).

Genotipificación de *P. vivax* sería de gran ayuda en trabajos posteriores referentes a la diferenciación de reinfecciones, recidivas y recrudescencias, estas últimas podrían ser debidas a tratamientos incompletos con drogas (Ayala y col. 2005). Un fragmento de 100 Kb de *P. vivax* proveniente de cinco cepas de diferentes áreas geográficas, “sinténico” al cromosoma 3 de *P. falciparum*, también promete ayudar en la identificación y en la historia evolutiva de este parásito (Brown y col 1992; Collins y col. 1999; Beingolea 2003).

2.5. Relación entre la Organización genómica de

***Plasmodium vivax* y el control de la malaria.**

Estudios previos han identificado 12 a 14 cromosomas lineares en un rango de tamaño de 1.2 a 3.5 Megabases (Mb). Diferentes tamaños entre cromosomas homólogos han sido detectados en aislamientos del campo de *P. vivax*, fenómeno que fue primero descrito en clonas del laboratorio y aislados de *P. falciparum* (Carlton 2003). Estimaciones iniciales basadas en Electroforesis en Campo Pulsado dan un tamaño de 35 a 40 Mb datos que se han tomado considerando genomas de otras especies de *Plasmodium*. Análisis de muchos genomas de este parásito usando ultracentrifugación y gradientes de cloruro de cesio establecen que el genoma nuclear de *P. vivax* tiene una estructura central. Las regiones terminales de este genoma tienen secuencias ricas en AT mientras que las regiones distales teloméricas son ricas en GC, contrariamente a *P. falciparum* que tiene una distribución uniforme de GC del 23%, con excepción de una región de 2 a 3 kb que tiene un contenido de AT mayor al 97% por lo que se piensa que son regiones que contienen los centrómeros (Feng y col. 2003; Abanja y col. 2005; Gunasekera y col. 2005). La evolución y función de la estructura central permanece en disputa, pero se especula que esta región central puede codificar genes que median fenómenos específicos de la patofisiología de malaria por *P. vivax*. Genes ortólogos previamente identificados de *Plasmodium* y un similar número de proteínas fueron encontrados entre los proteomas de *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. berghei*, este último presente en roedores (Oficina Sanitaria Panamericana 1993). Análisis funcionales de proteínas usando el sistema de clasificación también sugiere que similares proporciones de éstas existen en cada una de las categorías entre las tres especies. Una gran familia multigen que codifica de 600 a 1000 proteínas variables ha sido recientemente identificada en *P. vivax*, homólogos de las cuales han sido encontradas en especies de malaria de roedores. Esto hace probable que dichas proteínas jueguen un rol importante en la variabilidad antigénica del parásito las cuales se consideran que forman parte de una gran proporción del proteoma de *P. vivax* (Trenton y col. 2003).

El proyecto para secuenciar el genoma completo de *P. vivax* empezó en el año 2002, el cual se está desarrollando en el Instituto de Investigación Genómica (Institute for genomic research. TIGR- Rockville, MD, USA) con el principal objetivo de producir al menos una secuencia tan confiable como la obtenida en *P. falciparum* (Carlton 2003).

Dos objetivos básicos han sido planteados para investigar la genética de población del parásito de la malaria: 1) El entendimiento de la genética de población del parásito y la dinámica intrahospedero, incluyendo la estabilidad de las cepas y su complejidad de infección y 2) Estudiar la diversidad de genes específicos que codifican antígenos de vacunas y su asociación con resistencia a drogas antimaláricas (Leclerc y col. 2005; Fryauf y col. 2005).

Los estudios de la estructura poblacional señalan que la diversidad genética está dada por alelos que están espacialmente diversificados. Esta información es esencial para predecir y monitorear la efectividad de estrategias como son: 1) la utilidad de combinar drogas específicas o regímenes terapéuticos; 2) La dispersión de resistencia a drogas y la emergencia de parásitos resistentes a múltiples drogas; 3) El impacto a largo tiempo del uso de mosquiteros y 4) El origen de genotipos que pueden eludir la respuesta

inmune por vacunas multivalentes. El conocimiento de la diversidad genética puede también ser útil para probar la diferenciación geográfica y explicar la distribución espacial de alelos en un determinado loci. Esto puede proveer información básica para sistemas de supervivencia dirigidos a identificar el origen de aislamientos en áreas con importantes casos ocasionales de malaria (Ferreira y col 1998; Gyu Kho y col.1999; Mishra y col. 2005; Picot y col. 2005) .

Elevados niveles de polimorfismo han sido descritos para muchos parásitos, particularmente en antígenos que pueden estar bajo selección por inmunidad del hospedero, para esto se ha empleado técnicas de anticuerpos monoclonales y por detección de isoenzimas de *P. vivax* aislados del campo. Una mayor dificultad en este tipo de análisis radica en que no es factible realizar un cultivo *in vitro* de este parásito, siendo posible cultivarlo solamente en animales de experimentación como monos lo cual implica difícil disponibilidad y grandes costos (Fernandez y col. 2005).

Una preliminar comparación del genoma de *P. vivax* por "Open Reading Frames" (ORFs) frente a otras proteínas ya publicadas revelan que el 37% de genes putativos tiene homología a proteínas antes identificadas (78% de éstas son proteínas de *P. falciparum*) y el remanente 63% de proteínas no tiene aparente homología con ninguna otra. Una situación similar fue encontrada en el análisis del proteoma de *P. falciparum*. La identificación de genes ortólogos entre *P. vivax* y *P. falciparum* ayudará mucho a mejorar el conocimiento del genoma de *P. vivax*. Esta especie tiene diferentes características biológicas, como son la habilidad para formar hipnozoitos en el hígado y una preferencia para invadir y replicarse dentro de reticulocitos, características que no son compartidas con *P. falciparum* (Han y col. 2004).

OBJETIVOS

3.a) Objetivo General:

Genotipificar las cepas de *Plasmodium vivax* de la Amazonía Peruana y relacionarla con el grado de severidad de la enfermedad.

3.b) Objetivos Específicos:

-Determinar los mejores marcadores a utilizar en la genotipificación de *Plasmodium vivax*.

-Estudiar la variabilidad genética del parásito, con la ayuda de técnicas de biología molecular: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Polimorfismo de longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) y Polimorfismo generado por secuencias repetitivas (TR).

-Identificar factores de riesgo y/o protectivos para la severidad de la enfermedad, basados en los diversos genotipos encontrados.

MATERIALES Y MÉTODOS

A POBLACION DE ESTUDIO:

El estudio se realizó durante los años 2004 y 2005 en un total de 340 muestras de las cuales se eligió 294 pertenecientes a pobladores de la ciudad de Iquitos (Loreto) y sus alrededores (Figuras 2 y 3). Asimismo se incluyeron 8 muestras provenientes de Jaén (Cajamarca). El rango de edad de las personas muestreadas fue de 5 a 73 años (Tabla 1) Para ser incluidos en el presente estudio, las personas debieron tener los síntomas compatibles con malaria específicamente por infección con *P. vivax*. A todos los pacientes incluidos se les extrajo 4ml de sangre en tubos "vacutainer" conteniendo EDTA para la prueba de gota gruesa y frotis. Las muestras de sangre fueron trasladadas en cajas provistas con hielo seco a la Universidad Peruana Cayetano Heredia en Lima-Perú, para su procesamiento por las técnicas moleculares descritas posteriormente.

El mencionado estudio fue aprobado por el comité de ética de la Universidad de Johns Hopkins, la Asociación Benéfica PRISMA y la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Los pacientes incluidos en el estudio recibieron una ficha con información acerca del estudio (Anexo 1 y 2). Todos los datos fueron notificados al paciente o al jefe de servicio del Hospital.

B MÉTODOS:

4.1. Gota gruesa y frotis:

Para este método se utilizó una lámina portaobjeto para cada muestra, colocándose en un extremo de la lámina la gota de sangre del paciente, para observar la presencia del parásito y en el otro extremo se hizo el extendido para diferenciar la especie y conocimiento de la densidad parasitaria, las láminas fueron coloreadas con Giemsa y posteriormente observados al microscopio con objetivo de 100X. Los resultados fueron introducidos a una base de datos a la cual se tuvo acceso una vez finalizado el estudio. El procesamiento de esta técnica fue realizado en la ciudad de Iquitos por personal altamente capacitado.

4.2. Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó en un ambiente exclusivo para este proceso, a partir de 200 ul de sangre siguiendo el protocolo de un Kit comercial QIAamp DNA Blood (QIAGEN Sciences, Maryland 20874, USA). Las muestras de sangre, así como el ADN extraído permanecieron en una congeladora a -20°C, hasta el momento de su procesamiento. Antes de la genotipificación se realizó una cuantificación del contenido de ADN en cada muestra.

4.3. Nested PCR

El Nested PCR, es una variación del PCR en el cual se realiza dos PCR consecutivos para aumentar la especificidad y la sensibilidad de la prueba. En el primer PCR se amplificó un segmento del gen 18S del RNA ribosomal (SSUrRNA) específico del género *Plasmodium* a partir de éste se realizaron 2 PCR, uno específico para *P. vivax* y el otro específico para *P. falciparum*. Los "primer" usados y las condiciones seguidas fueron las de Roshanravan y col. (2003).

Los "primers" para el género *Plasmodium* fueron:

Plagen 1 = 5' CTT GTT GTT GCC TTA AAC TTC 3'

Plagen 2 = 5' TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG 3'

Ellos amplifican específicamente un fragmento de 1200 pares de bases (pb).

Las condiciones para realizar el PCR fueron las siguientes: 10 mM de Tris HCl, 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 0,25 µM de cada "primer", 0,3 Unidades de *Taq* polimerasa (INVITROGEN, life technologies) y 3 nanogramos (ng) de ADN. La reacción tuvo un volumen final de 25 µl.

Las condiciones de la Amplificación fueron: 3min a 95°C; 19 ciclos de 30 seg de 94°C, 1 min 30 seg de 58°C, 1 min 30 seg de 72°C; y finalmente 1 ciclo de 7 min a 72°C.

Los “primers” para la especie *Plasmodium vivax* fueron:

Vivax1 = 5' CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC 3'

Vivax2 = 5' ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA 3'

El producto de amplificación fue de 120 pb.

Los “primers” para la especie *Plasmodium falciparum* fueron:

Falciparum1 = 5' TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT 3'

Falciparum2 = 5' ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC 3'

El producto de amplificación fue de 205 pb.

Las condiciones de PCR para detectar tanto *P. vivax* como *P. falciparum* fueron las siguientes: 10 mM de Tris HCl, 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 250 μM de dNTPs, 0,50 μM de cada iniciador, 0,3 Unidades de *Taq* polimerasa (INVITROGEN, life technologies), el ADN agregado a cada reacción fue 1 ul de la amplificación anterior (a partir del primer PCR). La reacción tuvo un volumen final de 25 μl.

Las condiciones de la Amplificación fueron: 2 min a 95°C; 34 ciclos de 30 seg de 94°C, 1 min 30 seg de 60°C, 1 min 30 seg de 72°C; y finalmente 1 ciclo de 7 min a 72°C. Para todas las amplificaciones se utilizó un termociclador automático (PT-100 MJReserch).

A los “primers” utilizados para el diagnóstico de la especie de *Plasmodium*, se les evaluó la sensibilidad, con muestras positivas a malaria y su especificidad con muestras negativas y positivas a otros parásitos como *Toxoplasma gondii*. Las muestras positivas a otras especies de *Plasmodium* diferentes a las del estudio, así como las que presentaban malaria por especies mixtas no fueron incluidas (Figura 4).

Se cuantificó el ADN de todas las muestras, usando un Lambda DNA (INVITROGEN, life Technologies) para posteriormente someterlos a la prueba de tipificación por TR y MSP3 alfa.

4.4. Polimorfismo generado por Secuencias Repetitivas (TR):

Para observar el polimorfismo generado por TR, se realizó un PCR utilizando 33 pares de “primers” los cuales ya han sido diseñados a partir de un segmento de 100 Kb perteneciente a 5 cepas de *Plasmodium vivax*, provenientes de diferentes partes del mundo segmento que es “sintético” al cromosoma 3 de *Plasmodium falciparum* (Feng y col. 2003) (Tabla 03).

Para la realización del PCR se utilizó 5 ng de ADN, 0,25 μl de cada “primer” 1X de buffer (50mM KCl y 10mM de HCl), 150 μM de dNTPs y 0,5 unidades de *Taq* Polimerasa (INVITROGEN, life technologies) en un volumen de reacción de 50 μl.

Las condiciones de amplificación fueron: 94°C por 2 min y 35 ciclos de amplificación cada uno, fue 94°C por 20 seg, 55°C por 10 seg, 50°C por 10 seg, 65°C por 2 min y finalmente un ciclo de extensión a 65°C por 5 min; se utilizó un Termociclador (PT-100 MJReserch)

4.5. Proteína de Superficie del Merozoito (MSP3 alfa)

Para la amplificación de la proteína MSP3 alfa se realizó un Nested PCR, “primers” y condiciones ya establecidos. (Bruce y col. 1999; Cui 2003b).

Los “primers” utilizados para el primer PCR fueron:

P1VI. 5' CAGCAGACACCATTTAAGG 3'

P2VI. 5' CCGTTTGTTGATTAGTTGC 3'

Las condiciones del PCR fueron: 0,15 μ M de cada iniciador o “primers”, 50 mM KCl y 10 mM de HCl, 150 μ M de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 0,5 unidades de *Taq* Polimerasa (INVITROGEN, life Technologies) y 5 ng de ADN total en un volumen de reacción de 50 μ l.

Las condiciones de amplificación fueron: 94°C por 3 min y 34 ciclos de amplificación cada uno fue 94°C por 30 seg, 56°C por 30 seg, 68°C por 2.5 min y finalmente un ciclo de extensión a 68°C por 4 min. Se utilizó un Termociclador (PT-100 MJReserch).

Los “primers” utilizados para el segundo PCR fueron:

N1VI 5' GACCAGTGTGATACCATTAACC 3'

N2VI 5' ATACTGGTTCTTCGTCTTCAGG 3'

Las condiciones para este segundo PCR fueron similares a las usadas para el primer PCR. Se usó 1 μ l del ADN anterior.

Las condiciones de amplificación fueron: 94°C por 3 min y 29 ciclos de amplificación cada uno fue 94°C por 30 seg, 57°C por 30 seg 68°C por 2,5 min y finalmente un ciclo de extensión a 68°C por 4 min . Se utilizó el Termociclador PT-100 MJReserch.

Para realizar el Polimorfismo de la longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), la cantidad de ADN necesario para ser cortado con la enzima fue equivalente a 100 ng el cual fue digerido con 0,5 unidades de la Enzima *Hha1* (New England BIOLabs Inc.), e incubado a 37°C por 3 horas. Pasado el tiempo se realizó la electroforesis.

Para la ejecución de las técnicas moleculares antes mencionadas se utilizó 3 ambientes exclusivos, distantes uno del otro; un primer ambiente de recepción y procesamiento de muestras, el segundo de preparación de reactivos y ciclamiento y finalmente un ambiente para las corridas electroforéticas. La manera como se trabajó fue en esa secuencia, es decir que se extraía el ADN, se realizaba el PCR y finalmente se corrían los geles, en los cuales siempre se colocaron controles positivos y negativos. Por consiguiente en cada uno de ellos se utilizaron materiales propios del área como fueron micropipetas, tubos, equipos etc.

El 20% de las muestras fueron procesadas 2 veces con la finalidad de evaluar reproducibilidad del resultado.

4.6. Visualización de los productos del PCR

Todos los productos de amplificación generados con los PCR realizados fueron mezclados con rojo de cresol (1ng/ul) en proporción de 5: 1 antes de ser colocados en los geles de agarosa conteniendo 0.05mg de Bromuro de Etidio (SIGMA CHEMICAL CO)

Los geles de agarosa utilizados para todos los productos de amplificación fueron al 1.5%, excepto para los productos de los TR y los cortes generados con la enzima *Hha1*, en los cuales se usó geles de agarosa al 2% (INVITROGEN, life technologies).

4.7. Características de los “primers”

Los “primers” seleccionados para el presente trabajo, ya han sido utilizados en estudios previos, sin embargo, fueron evaluados con programas como: BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), CLUSTAL X (Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994), PRIMER PREMIER (<http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/index.html>), con la finalidad de dar mayor confiabilidad a los resultados obtenidos, para luego ser analizados.

4.8. Análisis de datos

Identificación de patrones. Los patrones moleculares obtenidos del parásito fue determinada empleando el software DNA Pro Scan's v 2.39 (1997), que realiza el cálculo automático del tamaño de cada banda de DNA de la muestra problema en base a su coeficiente de migración (Rf) y el tamaño del marcador utilizado (100 pb DNA ladder). Para la determinación de los patrones fue necesario generar una base de datos (Software: Excel) en la cual se preparó una base binomial de presencia y ausencia de bandas para los genotipos de cada marcador (Anexo 4). Previo ordenamiento ascendente de los datos (Columna A), se colocó en la columna próxima a la derecha (columna B) el número de 0 ó 1 según haya similitud o no con el patrón inmediato superior. Cada vez que en la columna B aparece un 1, la columna C se incrementa en 1, denotando la existencia de un nuevo genotipo.

Severidad de la enfermedad. Se establecieron dos grados de severidad, basados en la densidad parasitaria, como el resultado de las lecturas de las láminas con objetivo de inmersión luego de examinar 100 campos.

Se estableció la severidad (Ministerio de salud 1994) de la siguiente manera:

Severidad 1: Carga parasitaria mayor o igual a 3+ que significa de 21 a 200 parásitos por campo microscópico y 3 a más días de fiebre.

Severidad 2: Carga parasitaria mayor o igual a 2+ que significa 2 a 20 parásitos por campo y 3 a más días de fiebre.

Vale decir que la severidad 1, necesariamente está incluida dentro de la severidad 2

Los resultados obtenidos fueron interpretados mediante el análisis de regresión logística múltiple con el programa estadístico de Stata Versión 9.0 ajustando el efecto por potenciales variables confusoras. También fueron analizadas interacciones y términos de orden superior para cada variable independiente. La variable que denotó al genotipo fue

categorizada de acuerdo a los valores obtenidos en el anexo 4 y 5.

RESULTADOS

5.1. Control de calidad del Nested-PCR

Del total de muestras colectadas, solamente 302 fueron incluidas en el estudio, por ser confirmadas positivas a *P. vivax* por el Nested PCR (302/340). De las muestras totales recolectadas por PCR se encontraron: 302 positivas a *P. vivax*, 7 positivas a *P. falciparum*, 4 positivas a ambos parásitos y 27 negativas. La técnica de gota gruesa y el PCR tuvieron 99% de concordancia en sus resultados (2 muestras negativas por gota gruesa fueron positivas a *P. vivax* por PCR, y 1 muestra positiva a *P. vivax* por gota gruesa fue positiva a *P. falciparum* por PCR). Los resultados obtenidos durante todo el proceso, indicaron mayor prevalencia de *P. vivax* que de *P. falciparum* (Figura 4).

Las pruebas de PCR realizadas con concentraciones mayores a 30 ng no produjeron amplificación para MSP3 alfa; en estas muestras se procedió a realizar diluciones, encontrándose que la dilución 1/10 fue la que mejor resultados proporcionó.

5.2. Diversidad de genotipos con TR.

En el presente trabajo se ha utilizado como primer marcador, secuencias repetitivas (TR), para lo cual se evaluaron 33 pares de “primers” ya reportados que amplifican diferentes grupos de nucleótidos denominados “Tandem Repeat” (TR). Todos ellos diseñados a partir de un segmento de 100 Kb de *P. vivax* “sintético” al cromosoma 3 de *P. falciparum*, parásito del cual ya se tiene bastante información. De los 33 pares de “primers” utilizados primeramente con 30 muestras seleccionadas de diferentes zonas de Loreto se eligieron 9 debido a que permitieron detectar mayor polimorfismo (Tabla 02 y 03). En el presente estudio realizado con 302 muestras y utilizando los 9 “primers” mencionados anteriormente, se logró observar variabilidad equivalente a un total de 102 genotipos (Tabla 04 y Figuras del 7 al 15), de los cuales 78(76%) fueron patrones simples, (se apreció una sola banda) y 24 (24 %) fueron mixtos (con doble banda) (Figura 16). Con los Primers MN23 se observaron 11 patrones simples y 7 mixtos (Figura 9B, Tabla 4 y 5), el tamaño de amplificación reportado para estos “primers” fue de 225 pares de bases (pb); en este estudio se encontraron patrones entre 219 y 350 pb, y los que menor polimorfismo mostraron fueron los “primers” MN3, MN12 y MN24 todos con 6 patrones simples, diferenciándose en el número de patrones mixtos con 0, 1, y 2 respectivamente. De las 8 muestras provenientes de Jaén, 4 presentaron un patrón de 184pb con el TR MN29, patrón no detectado en ninguna población de Loreto (Tabla 05, Figura 10B). Los 9 “primers” utilizados nos han permitido encontrar un gran polimorfismo en las cepas de *P. vivax* de nuestra Amazonía, trabajo realizado por primera vez en nuestro país.

5.3. Diversidad de Genotipos con MSP3 alfa.

Con el marcador MSP3 alfa se lograron amplificar 3 fragmentos de diferentes tamaños: El 78% amplificó un fragmento de 1950 pb (A), el 20% de 1500 pb (B) y el 2% de 1200 pb (C) (Figura 5. Anexo 3). Estos 3 fragmentos, inicialmente amplificados, al ser digeridos con la enzima *Hha1* generaron 9 patrones diferentes, las bandas generadas por esta enzima presentaron tamaños entre 188 a 530 pb. En todos estos genotipos se observó la presencia de una banda común de 1070 pb (Figura 6), la cual no indicó polimorfismo, por lo tanto no permitió discriminar entre patrones. El patrón que predominó fue el 5 (72/302, 23.8%) en tanto que el patrón del parásito que menor número de pacientes tuvo fue el 9 (9/302, 2.9%) (Tabla 07, Figura 17). En todas las muestras recolectadas en la ciudad de Iquitos, no se observó un genotipo especial por localidad. En el caso de Jaén fueron encontrados con este marcador apenas 2 genotipos, predominando el genotipo 1 (7/8) (Tabla 11).

Con el marcador MSP 3 alfa, se identificó un patrón mixto, debido a que la suma de las bandas generadas después del corte con la enzima *Hha1*, fue mayor que el producto sin cortar, evidenciando la posible presencia de dos genotipos de *P. vivax* en la misma muestra del paciente (Tabla 07- P9).

Los “primers” utilizados para MSP3 alfa fueron evaluados con programas de bioinformática encontrándose que eran específicos para *P. vivax* y no reaccionaron frente a otra especie de *Plasmodium* (Tabla 03).

5.4. Severidad de la enfermedad y su relación con el genotipo del Parásito

Todos los genotipos encontrados fueron comparados con el grado de severidad de la enfermedad catalogada como: Severidad 1 (24 pacientes) y Severidad 2 (128 pacientes).

En cuanto a la genotipificación con los TR, a ninguno de los patrones obtenidos se le encontró relación con el grado de severidad ($p > 0.05$ y $OR < 1$), pero cuando se agruparon por delecciones (P1, patrones cuyo tamaño de banda es menor que la reportada), patrones reportados (P2), inserciones (P3, patrón cuyo tamaño de banda es mayor que la reportada), y patrones mixtos (P4, presencia de dos bandas en la misma muestra) (Tabla 06), se observó que con el primer MN17 la presencia de un patrón generado por inserción de TR (P3) estaba asociado con mayor grado de severidad de enfermedad (severidad 1), también fue significativo este resultado cuando se evaluó frente a los demás patrones (P1 y P2 - $P < 0.05$ y $OR > 1$) (Tabla 08). Con el primer MN4 se encontró que el patrón reportado con 160 pb (P2) estaba relacionado a casos de mayor grado de severidad (Tabla 9), pero esto no fue significativo cuando se analizó frente a los otros patrones (P1, P3 y P4).

De los 9 genotipos observados con el marcador MSP3 alfa, se encontró que el 7 estaba relacionado con la severidad 1 de la enfermedad ($p = 0.015$, $OR = 16.71$) y también con severidad 2 ($p = 0.036$, $OR = 3.42$). Al evaluarse este patrón frente a todos los demás también resultó significativo ($p < 0.05$). Ningún patrón encontrado con MSP3 alfa estuvo relacionado con un factor de protección frente a la enfermedad ($OR > 1$) (Tabla 10).

Las características demográficas (edad, sexo, y ocupación), así como la época en la que se presentó la enfermedad no se asociaron a la severidad de la misma ($p > 0.05$. Tablas 8, 9 y 10). El 82% (194/237) de la población en estudio estuvo en edad ocupacionalmente activa (12- 50 años- Tabla 01 y Anexo 3).

DISCUSIÓN

6.1. Utilización del PCR en el control de calidad.

En el Perú en los años 2004 y 2005 se ha reportado un promedio de 83% de casos de malaria por *P. vivax* y 17% por *P. falciparum*, resaltando que la prevalencia de *P. vivax* tiene una tendencia a seguir en aumento, mientras que la de *P. falciparum* tiende a disminuir (MINSA-DGE-RENACE-Junio 2006). Durante los 2 años de recolección de muestras el 88% (302/340) ha sido positivo a *Plasmodium vivax*, resultados que corroboran la estadística antes mencionada. Se eligió Iquitos para la realización del presente estudio, por ser considerada zona hipoendémica de malaria en nuestro país, esto se debe probablemente a que está asociado geográfica y ecológicamente a zonas tropicales de la costa norte, ambientes que favorecen grandemente la presencia del zancudo vector de la malaria, siendo *Anopheles darlingi* el que actualmente está predominando en esta región. El presente estudio tiene dos grandes aportes, el hallazgo de la real prevalencia de malaria en Iquitos y la diversidad de genotipos presentes en ella, lo cual ha sido posible lograr con la ayuda de técnicas de Biología Molecular, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) catalogada como de gran sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la especie de *Plasmodium* (Singh y col.1996). La Oficina Sanitaria Panamericana (1993), también menciona la importancia de confirmar la especie de *Plasmodium* circulando en la zona, debido a que esta información es muy

valiosa al momento de elegir las medidas de tratamiento, control y prevención de la enfermedad. Considerando estos datos, todas las muestras incluidas en el estudio antes de ser genotificadas fueron confirmadas de ser positivas al parásito estudiado, básicamente por 2 razones: Genotipificar al parásito correcto y para que el paciente reciba el tratamiento apropiado, de lo contrario la negativa respuesta del paciente al tratamiento se podría atribuir a casos de resistencia que realmente no lo serían. El PCR realizado en el estudio utilizó "primers" específicos de la especie de *Plasmodium* evaluada, El diagnóstico por PCR se efectuó sin ningún conocimiento previo de los resultados obtenidos por la técnica de gota gruesa y frotis, realizados en la ciudad de Iquitos por personal altamente capacitado y con años de experiencia en estas técnicas. El uso del microscopio para detectar parásitos de malaria en coloración sigue siendo considerada como la técnica más práctica y relevante para detectar parásitos en muestras de sangre, por lo que es económica, fácil de ejecutar y si lo realiza un experto aparte de diferenciar la especie, podemos cuantificar la carga parasitaria. Sin embargo, tiene la desventaja de no ser tan buena cuando la parasitemia es baja, en infecciones mixtas, después del tratamiento con drogas o durante la fase crónica de la enfermedad (Vargas y col. 2003). No se tuvo problemas de contaminación durante el procesamiento de las muestras, comprobándose esto al observar que en todo momento las muestras usadas como controles negativos permanecieron negativas.

6.2. Diversidad de genotipos en la población muestreada.

Cuando se genotipificó con TR se observó que el 24% de las muestras presentaban doble banda. Si consideramos que cada muestra fue confirmada de ser positiva únicamente a *P. vivax*, la detección de más de una banda fue sinónimo de presencia de más de un genotipo del parásito en la muestra estudiada, similar resultado fue el obtenido por otros investigadores, quienes refirieron el 26% de infecciones mixtas (Leclerc y col. 2004).

Debido a que los TR no codifican moléculas antigénicas no pueden ser seleccionados para evaluar respuesta inmune en el humano infectado. Este polimorfismo con los TR fue mayor que el encontrado con el gen que codifica la proteína MSP3 alfa usado por muchos investigadores, esto debido a que la secuencia de sus nucleótidos es más sensible a sufrir cambios, los cuales pueden estar relacionados con el vector incluso al genotipo del vector, el ambiente o el hospedero (Duarte y col. 2004).

La variedad de genotipos encontrados lo atribuimos a la migración de la población por sus tareas laborales también debido a que es una zona turística de mucha importancia en nuestro país, y a la variedad de su vector (Taylor 1999). Todas las razones antes expuestas también pueden explicar el hecho que 4 de 8 muestras (50%) provenientes de Jaén, hayan presentado un patrón de 184 pb. con los TR MN29, patrón no observado en ninguna población de Iquitos.

En la genotipificación con el marcador MSP3 alfa se utilizó la enzima *Hha1*, la cual cortó el ADN de la proteína en sitios específicos, permitiéndonos clasificar al parásito en 9 genotipos. Los cuales estuvieron presentes en todas las poblaciones de la ciudad de Iquitos durante la realización del estudio. Esto refleja activa circulación de ellos dentro de la ciudad (es decir si un genotipo identificado en una persona en determinado tiempo, no está presente en ella, significaría que meses después estaría presente en otra).

La utilización del marcador MSP3 alfa ha sido reportado en otros países con buenos resultados para la genotipificación de cepas de *Plasmodium vivax*, como el realizado por Cui y col (2003b) al Oeste de Tailandia, donde encontraron 13 genotipos, número mayor considerando los 9 observados en este estudio, de los cuales al menos 5 son similares a los encontrados en Tailandia; en el mismo trabajo ellos también usaron como marcador la proteína del circunsporozoito (CSP) para analizar la diversidad genética de *P. vivax*, encontrando sólo 2 formas del parásito: VK210 y VK247, formas no consideradas en el presente estudio. Otros investigadores, han estudiado el polimorfismo de *Plasmodium vivax* con genes que codifican la proteína AMA1 y la proteína MSP1, estudio que realizaron en poblaciones de África, China, India, Indonesia y Filipinas, con la finalidad de encontrar diversidad genética del parásito entre países, encontrando que hay diferencias significativas entre frecuencias alélicas de diferentes regiones; no obstante estas diferencias fueron pequeñas comparadas a la diversidad entre poblaciones (Gunasekera y col. 2005). En un previo trabajo de investigación que realizamos en nuestro país con 50 pacientes, todos ellos positivos a *P. vivax*, encontramos que presentaron con el marcador MSP3 alfa un único tamaño de amplificación de 1950 pb y que al ser cortado con la enzima *Hha1* generaron 5 patrones diferentes (trabajo realizado en el año 2000 no publicado y continuado en el presente estudio). En este trabajo se ha encontrado, a parte del tamaño de, 1950 pb, también tamaños de 1500 y 1200 pb tamaños que estarían influyendo en la aparición de nuevos genotipos. Estos hallazgos nos permiten decir que la proteína MSP3 alfa no cumple una función limitante en la vida del parásito, pero quizás sí en el comportamiento del mismo. .

Todos los pacientes incluidos en el estudio tuvieron síntomas compatibles con malaria. Un estudio similar fue el desarrollado en Panamá (Boletín Semanal del Sistema Nacional de Información en Salud 2003), en el cual analizaron varios genes altamente polimórficos presentes en *P. falciparum* (MSP-1, MSP-2 y GLURP) y en *P. vivax* (MSP3 alfa y CSP) que circulan en áreas endémicas de ese país. Para ello también realizaron una búsqueda activa de pacientes con sintomatología compatible con malaria, la infección por *Plasmodium* lo confirmaron mediante un PCR Múltiple, que amplificó simultáneamente las especies de mayor prevalencia en el país: *P. vivax* y *P. falciparum*, las muestras positivas fueron analizadas por técnicas moleculares (PCR-RFLP y PCR-SSP) para determinar los alelos del parásito presentes en los genes evaluados. Estos hallazgos permitieron a las autoridades determinar tempranamente brotes de malaria causadas por cepas diferentes a la autóctona, y que presenten características como la resistencia a determinadas drogas antimaláricas y/o una mayor virulencia. Carlton (2003) en su trabajo referente al proyecto de secuenciamiento de genoma de *P. vivax*, menciona que la estructura genética de *P. falciparum* ha sido estudiado en mayor detalle que la de *P. vivax*, contándose con poco aporte respecto a este último. El presente

trabajo, es el primero realizado en nuestro país en lo que respecta a genotipificar *P. vivax* usando estos 2 marcadores, encontrando que la diversidad genética de *P. vivax* es considerable y con tendencia a seguir en aumento. En nuestro país se ha desarrollado un trabajo similar de genotipificación para *P. falciparum* en la región de Loreto (Ayala y col. 2005), en el cual se considera de particular importancia desarrollar trabajos de genotipificación, en zonas endémicas en las cuales pueden haber casos de infecciones mixtas, resistencias a drogas, y la necesidad de saber distinguir si se trata de reinfecciones o recidivas (Viriyakosol y col. 1999; Katsnelson y col. 2005; Salas y col. 2005).

Cuando se relacionó los genotipos encontrados con el marcador MSP3 alfa, con los lugares de muestreo en la ciudad de Iquitos no se encontró mayor predominio de un genotipo por localidad, lo que indicaría que existe una activa circulación de estos genotipos dentro de la zona. Este hallazgo se atribuye a que la mayoría de los lugares muestreados estuvieron ubicados en un rango aproximado de 50 Km. Sin embargo cuando se relacionó los genotipos de la zona de Iquitos con los de Jaén si se halló una diferencia, predominando en esta última región casi un único patrón P1 (7/8) esto se atribuye a la existencia de factores condicionantes como cambios climáticos lo que haría posible que aparezca o predomine un determinado patrón, hay que recalcar que de Jaén solamente se incluyeron 8 muestras, por lo cual se debe abordar de manera cuidadosa para un mejor entendimiento.

El conocimiento de la diversidad genética puede ser usado para ensayos de diferenciación geográfica y explicar la distribución espacial de alelos en un loci dado, por ejemplo nos puede dar una información básica para conocer el origen del aislamiento, grado de evolución y poder de adaptación del parásito en zonas con ocasionales casos de malaria importada (Abanja y col. 2005, Coldren y col 2005a).

6.3. Relación de genotipos con la severidad de la enfermedad.

Este estudio representa la primera contribución de genotipificación de *Plasmodium vivax* y su relación con la severidad de la enfermedad en nuestro país, utilizando dos marcadores moleculares. Los patrones encontrados con los TR al ser evaluados estadísticamente en forma individual no guardaron relación con el tipo de severidad de la enfermedad, pero cuando éstos se agruparon por delecciones (P1), patrón reportado (P2), inserciones (P3) y patrón mixto (P4), si se halló significativa relación, datos importantes en estudios epidemiológicos. Con los TR se ha demostrado que el polimorfismo en nuestra Amazonía va en aumento. En el análisis estadístico de los genotipos obtenidos con el marcador MSP3 alfa se halló que el genotipo 7 estuvo relacionado a los dos grados de severidad considerados en el estudio. Este hallazgo es de sustancial y práctica importancia en esta investigación y en posteriores estudios de candidatos a vacunas, como también en el entendimiento de la transmisión de la enfermedad. Hay que considerar que a pesar que estos pacientes presentaron malaria severa, todos ellos

respondieron adecuadamente al tratamiento con drogas administrado por la Organización Mundial de la Salud (1994). En el estudio, los datos como edad, sexo u ocupación no influyeron en el grado de severidad de la enfermedad. Un trabajo similar fue el realizado por otros investigadores en el centro de salud Cardoso-Iquitos, cuyo objetivo fue identificar y describir factores asociados a la presentación de esta enfermedad en la población atendida, encontrándose una prevalencia de 2.3%. El 72.5% correspondieron a *P. vivax* y el 27.5% a *P. falciparum*. Los principales factores asociados a la presentación de malaria fueron los viajes a zona rural ($p < 0.001$), como viajes a poblados del río Nanay ($p = 0.02$) y el antecedente de haber presentado antes la enfermedad ($p < 0.001$). Los autores también identificaron como factor de protección, el baño en una habitación cerrada ($p = 0.02$) (Vargas y col. 2003).

En el presente estudio se ha relacionado cada patrón de *P. vivax* con la severidad de la enfermedad en función a densidad parasitaria y días de fiebre, no obstante conocer que la severidad en algunos pacientes no es muy clara, que el hecho de haber tomado la muestra por única vez en cada uno de ellos podría darnos un margen de error y el no haber tenido un número considerable de muestras, se ha podido observar que hay patrones que están relacionados a severidad de la enfermedad. Al respecto Solari y col (2002), compararon las densidades parasitarias y resultados de la gota gruesa obtenidos por punción venosa versus los obtenidos por digitopunción en malaria por *Plasmodium vivax*, no hallando diferencia significativa, trabajo que realizaron debido a que, el nivel de parasitemia es importante para estimar el grado de severidad de la malaria y evaluar la respuesta al tratamiento administrado; mencionan que realmente no hay un método universalmente aceptado para calcularla. En consecuencia, al respecto se siguen realizando numerosos estudios.

El punto clave para el entendimiento de la complejidad genética de *P. vivax* estaría influenciado por la transmisión intensa, la densidad parasitaria, vector, tiempo de establecimiento en un área endémica o por el tipo y tiempo de tratamiento, aspectos ya discutidos por Kain y col. (1992b) en su trabajo referente a caracterización genética de *P. vivax*. La clave para identificar la fuente de la transmisión de la malaria está en saber discriminar entre cepas infectantes de parásitos de *Plasmodium* que puedan ocasionar un alto grado de severidad de la enfermedad.

En los estudios de polimorfismo de *P. vivax* se ha mencionado que la habilidad para describir la diversidad genética del parásito y su importancia en la enfermedad, esta relacionada con la variación que exista en el tamaño del gen que codifica la proteína MSP3 alfa, cuyo tamaño está influenciado por deleciones o inserciones, así como por presencia de polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) (Brega y col. 2004).

6.4. La genotipificación en el control y manejo de la malaria.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que en la Amazonía Peruana

circulan un gran número de genotipos de este parásito. Los TR que mayor polimorfismo presentaron fue el MN23 (11 genotipos simples y 7 genotipos mixtos), lo cual indica que en esta región el ADN está variando constantemente y por lo tanto es de gran utilidad si uno quiere conocer el mayor polimorfismo del parásito constituyendo un gran desafío en el control de la enfermedad. Estos resultados pueden variar según la población que se estudie. En otros estudios en diferentes poblaciones se han encontrado muestras que no amplifican con los “primers” antes mencionados (experiencia personal), eso nos hace pensar que puedan haber mutaciones en estas zonas conservadas del genoma impidiendo la amplificación del segmento deseado.

La diversidad generada por la recombinación genética del parásito de la malaria puede presentar variaciones de acuerdo con las características de la transmisión de la enfermedad en una región. En primer lugar, un mosquito vector puede ingerir sangre infectada con gametocitos pertenecientes a un solo clon (principalmente en zonas de baja transmisión); en este caso, los eventos de fertilización se presentan entre gametocitos genéticamente idénticos y, por consiguiente, originan cigotos (diploides) homocigóticos en todos los loci. Si un individuo está infectado con múltiples clones del parásito, por ende, el mosquito *Anopheles* puede ingerir gametocitos pertenecientes a clones genéticamente distintos. Este hecho puede conducir a la formación de cigotos heterocigotos, en los cuales la recombinación desemboca en la producción de nuevas combinaciones de genes dentro de la progeñe haploide (esporozoitos).

Con el marcador MSP3 alfa se encontró que el patrón 7 está relacionado con malaria severa por *P. vivax*; este genotipo podría en algún momento ser el causante del desencadenamiento de una epidemia en nuestro país. El genotipo 5 fue el que se encontró con mayor frecuencia, indicando quizás ser uno de los más ancestrales. Considerando que MSP3 alfa es una proteína del merozoito del parásito y que cumple cierta función en la invasión al glóbulo rojo, una rápida multiplicación del parásito alcanzaría una gran densidad parasitaria antes que el hospedero empiece a formar anticuerpos protectivos, por lo tanto contribuiría a la severidad de la enfermedad. La importancia del presente estudio radica en que los resultados obtenidos pueden ser útiles para la aplicación de medidas de control de la malaria (Udhayakumar 2005). Referente a esto coincidimos con otros investigadores (Cui y col. 2003a), al considerar que estos conocimientos son altamente relevantes en las medidas de control de brotes de enfermedades. Por ejemplo, la predicción de un flujo de mutaciones resistentes a drogas a través de poblaciones de parásitos tiene como consecuencia el tipo y rango de terapias que deben validarse para protección de la salud de la población en ciudades endémicas.

Nuestros datos demuestran que *P. vivax* tiene abundante polimorfismo y puede representar algunos desafíos para el desarrollo de drogas y vacunas. Conclusiones a las que también han llegado Feng y col. (2003); Gómez y col. (2003), Ellos también encontraron con *P. vivax* alta frecuencia de polimorfismo, solo que con el análisis de SNP, y que resultó ser mayor que el reportado para el genoma de *P. falciparum*.

Roshanravan y col. (2003), menciona que los cambios en la dinámica del vector parecen estar asociado con los cambios epidemiológicos de la enfermedad en la región. El ingreso de *Anopheles darlingi* en la ecología de Loreto ha sido temporalmente relacionado con el incremento de la transmisión de malaria, especialmente por *P.*

falciparum en esta región.

La importancia de este trabajo ha radicado en que se ha demostrado con la ayuda de estos dos marcadores: TR y MSP3 alfa, la gran variabilidad genética de *Plasmodium vivax*, en la Amazonía Peruana, la cual puede influir en la eficacia de medidas de control como los medicamentos y las vacunas, siendo los TR los que nos han permitido encontrar mayor polimorfismo (Leclerc 2005)

Debido a que toda la población estudiada manifestó ser de esa región es muy difícil aseverar que la variedad de genotipos circulando en Iquitos se deba a una cepa introducida, más que a una cepa ya presente en dicha región. Hay que considerar que Iquitos es una zona turística importante de nuestro país, por lo tanto, es posible que cepas del exterior puedan ser fácilmente incorporadas. Individuos que viajan fuera de su ciudad pueden infectarse con el parásito y luego a su retorno introducir este nuevo genotipo; de forma similar las migraciones de los habitantes pueden tener el mismo factor de riesgo para introducir nuevas cepas de *P. vivax* dentro de la ciudad. Este alcance será de importancia crítica para el éxito de las intervenciones en el control de la malaria

La complejidad y la diversidad genética de *Plasmodium* son en gran parte responsables del éxito de la supervivencia de este parásito en la historia evolutiva, así como del fracaso de las medidas empleadas con el objeto de erradicarlo. De allí la importancia de realizar trabajos referentes a genotipificar *Plasmodium spp.*, por otro lado, la diversidad genética le confiere al parásito la capacidad para evadir la respuesta inmune del hospedero y producir variantes resistentes a medicamentos y a vacunas, todas estas características relevantes para el manejo y control de la malaria no solamente en la región Amazónica sino también en otras regiones del mundo con dinámica de transmisión similar.

CONCLUSIONES

- Con los dos marcadores utilizados se demostró que en la Amazonía Peruana circulan diferentes cepas de *Plasmodium vivax* (102 cepas con TR y 9 con MSP3 alfa).

- Se determinó con TR que el parásito que presenta un segmento de inserción al ADN normalmente reportado está relacionado a la enfermedad más severa.

- Con el Marcador MSP3 alfa se encontró un patrón (P7) relacionado con la severidad de la enfermedad.

- El principal factor para el mantenimiento de la transmisión de *Plasmodium vivax* en las zonas rurales de la Amazonía Peruana estaría estrechamente relacionado con la incursión de nuevos genotipos del parásito por visitantes o por pobladores de la misma zona.

- Los marcadores de polimorfismo TR y MSP3 alfa son de gran ayuda para evaluar la variabilidad de las cepas del parásito en esta zona, pudiéndose utilizar también para el diagnóstico, tratamiento y control de la malaria en nuestro país.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abanja RN, Githeko AK, Zhou G, Cui L, Yan G. (2005). "Population Genetic Structure of Plasmodium falciparum in Western Kenya Highlands." Abstract Book. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting 73(6): 283.
- Aramburu J, Ramal C, Witzig R, (1999). "Malaria Reemergence in the Peruvian Amazon region." Emerg Infect Dis . 5(2): 209-215.
- Aubouy A, Migot-Nabias F, Deloron PH. (2003). "Polymorphism in Two Merozoite Surface Proteins of Plasmodium falciparum Isolates From Gabon." Malar j. 2(12): 1-6.
- Ayala E, Lescano AG, Gilman RH, Calderon M, Pinedo V, Terry H, Cabrera L, Vinetz J. (2005). "Polymerase Chain Reaction and Molecular Genotyping To Monitor Parasitological Response To Anti-Malarial Chemotherapy in the Peruvian Amazon." Am. J. Trop Med. Hyg 74(4): 546-553.
- Baird JK. (2004). "Chloroquine resistance in Plasmodium vivax." Antimicrobial Agents and Chemotherapy 48(11): 4075-4083
- Barry AE. (2005). "Malaria Epidemiology: Insights from the Genome of the Malaria Parasite." Journal of Molecular and Genetic Medicine 1(2): 76-86.
- Beingolea L. (2003). "Situación de la Malaria en el Perú." Boletín Epidemiológico Semanal (8).
- Bharti P, Mishra AK, Chand SK, Singh N. (2005). "Epidemiology of Malaria in an area of Low Malaria Transmission in Central India." Abstract Book. American Society of

- Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting 73(6): 125.
- Boletín Semanal del Sistema Nacional de Información en Salud (2003). "Evaluación de la Eficacia Terapéutica de la Cloriquina para el tratamiento de la Malaria en las Provincias de Vaca Díez del Departamento del Beni y Gran Chaco del Departamento de Tarija- Bolivia " (7).
- Bray P, Deed S, Fox E, Kalkanidis M, Mungthin M, Deady LW, Tilley L. (2005). "Primaquine Synergises the Activity of Chloroquine Against Chloroquine-Resistant *P.falciparum*." *Biochemical Pharmacology* 70: 1158-1166.
- Brega S, De Mombroson 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." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(7): 2581.
- Brookes AJ. (1999). "The Essence of SNPs." *GENE* 234: 177-186.
- Brown AE, Kain KC, Pipithkul J, Webster K. (1992). "Demonstration by Polymerase chain Reaction of Mixed *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections undetected by Conventional Microscopy." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 86: 609-612.
- Bruce MC, Galinski MR, Barnwell JW, Snounou G, Day KP. (1999). "Polymorphism at the merozoite Surface protein 3 & Locus of *Plasmodium vivax* Global and local diversity." *Am.J. trop med Hyg* 6(4): 518-525.
- Carlton J. (2003). "The *Plasmodium vivax* genome Sequencing project." *TRENDS in Parasitology* 19(5): 227-231.
- Ceravolo IP, Bruna-Romero O, Braga EM, Fontes CJ, Brito CF, Souza JM, Krettli AU, Adams JH, Carvalho LH. (2005). "Anti-*Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein Antibodies Measure Exposure to Malaria in the Brazilian Amazon." *Am.J. trop med Hyg* 72(6): 675-681.
- Certain L, Sibley CH. (2005). "Pilot Study of Sulfadoxine -Pyrimethamine resistance Using A novel Method To Analyze Mixed Infections." *Abstrat Book. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting* 73(6): 371.
- Coldren R, Mbui J, Bedno S, Achillar R, Segecha S, Waters NC. (2005a). "Recent Antimalarial Treatment Among Kenyan Adults Presenting To Clinics With Positive Malaria Smears." *Abstrat Book. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting* 73(6): 379.
- Coldren R, Waters N, Bedno S, Segecha S, Mbui J. (2005b). "A case control Study Examining Recent Antimalarial use Among Patients Admitted with Malarial and Other Febrile Illnesses in Kenya." *Abstrat Book. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting* 73(6): 380.
- Collins A, Lonjou C, Morton NE. (1999). "Genetic Epidemiology of Single Nucleotide Polymorphisms." *PNAS* 96(26): 15173-15177.
- Contamin H, Fandeur T, Bonnefoy S, Skouri F, Ntoumi F, Mercereau O. (1995). "PCR Typing of Field Isolates of *Plasmodium falciparum*." *Journal of Clinical Microbiology* 33(4): 944-951.
- Cui L, Escalante AA, Imwong M, Snounou G. (2003a). "The Genetic Diversity of

- Plasmodium vivax Populations." *TRENDS in Parasitology* 19(5): 220-226.
- Cui L, Mascorro CC, Fan Q, Rzomp KA, Khuntirat B, Zhou G, Chen H, Yan G, Sattabongkot J. (2003b). "Genetic Diversity and Multiple Infections of Plasmodium vivax Malaria in Western Thailand." *Am.J. trop med Hyg* 68(5): 613-619.
- Duarte EC, Gyorkos TW, Pang L, Abrahamowicz M. (2004). "Epidemiology of Malaria in a Hypoendemic Brazilian Amazon Migrant Populations: A Cohort Study." *Am.J. trop med Hyg* 70(3): 229-237.
- Felger I, Irion A, Steiger S, and Beck HP.(1999). "Epidemiology of Multiple Plasmodium falciparum infections. Genotypes of merozoite Surface protein 2 of Plasmodium falciparum in Tanzania." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 93(1): S1/3-S1/9.
- Feng X, Carlton JM, Joy DA, Mu J, Furuya AT, Suh B, Wang Y, Barnwell JW, SU X. (2003). "Single-nucleotide Polymorphisms and Genoma Diversity in Plasmodium vivax." *PNAS* 100(14): 8502-8507.
- Fernandez O, Manzano MR, Murrain B, Blanco P, Zamora F, Jordan A, Palacios R, Velez JD, Arevalo-Herrera M, Herrera S. (2005). "Development of a Sporozoite Challenge Model For Plasmodium vivax in Human Volunteers." *Abstrat Book. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting* 73(6): 359.
- Ferreira MU, Kaneko O, Kimura M, Liu Q, Kawamoto F, Tanabe K. (1998). "Allelic Diversity at Merozoite Surface Protein-1 (MSP-1) LOcus in Natural Plasmodium falciparum Populations: a Brief Overview." *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 93(5): 631-638.
- Figtree M, Pasay CJ, Slader R, Cheng Q, Cloonan N, Walker J, Saul A. (2000). "Plasmodium vivax Synonymous Substitution frequencies, evolution and population Structure deduced from Diversity in AMA 1 and MSP 1 Genes." *Molecular and Biochemical Parasitology* 108: 53-66.
- Fryauf DJ, Anto F, Maguire J, Flanagan J, Atuguba F, Koram K, Hodson A, Susanti I, Owusu-Agyei S. (2005). "Molecilar Markers of Resistance in Plasmodium falciparum and in Vivo Outcomes of Chloroquine or Fandidar Treatments for Uncomplicated Falciparum Malaria in Young Children of Northern Ghana." *Abstrat Book. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting* 73(6): 371.
- Gomez JC, Mcnamara DT, Bockrie MJ, Baird JK, Carlton JM, Zimmerman PA. (2003). "Identification of a Polymorphic Plasmodium vivax Microsatellite Marker." *Am.J. trop med Hyg* 69(4): 377-379.
- Gonzalez JM, Hurtado S, Arevalo-Herrera M, Herrera S. (2001). "Variants of the Plasmodium vivax Circumsporozoito protein (VK210 and VK 247) in Colombia Isolates." *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 96(5): 709-712.
- Gunasekera AD, Wickramarachchi T, Ganguli I, Perera L, Premaratne PH, Dissanayake D, Udagama-Randeniya PV, Handunnetti SM, Wirth D. (2005). "Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms at the Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1 (PVAMA1) locus among SRI Lankan Isolates" *Abstrat Book. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting* 73(6): 283.
- Gyu Kho W, Park Y, Chung J, Kim J, Hong S, Lee Won, Kim T, Lee J. (1999). "Two New Genotypes of Plasmodium vivax Circumsporozoite Protein Found in the

- Republic of Korea." *The Korean Journal of Parasitology* 37(4): 265-270.
- Han ET, Song TE, Park JH, Shin EH, Guk SM, Kim TY, Chai JY. (2004). "Allelic Dimorphism in the Merozoite Surface Protein- 3 alpha in Korean Isolates of *Plasmodium vivax*." *Am.J. trop med Hyg* 71(6): 745-749.
- Hanna JN, Ritchie SA, Eisen DP, Cooper RD, Brookes DL, Montgomery BL. (2004). "An outbreak of *Plasmodium vivax* Malaria in far North Queensland, 2002." *Public Health* 180: 24-28.
- Hastings MD, Maguire JD, Bangs MJ, Zimmerman PA, Reeder JC, Baird JK, Sibley CH. (2005). "Novel *Plasmodium vivax* dhfr Alleles from the Indonesian Archipelago and Papua New Guinea: Association with Pyrimethamine Resistance Determined by a *Saccharomyces cerevisiae* Expression System." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(2): 733-740.
- Hijar G, Quino H, Padilla C, Monyoya I. (2002). "Variabilidad genética de *Plasmodium falciparum* En Pacientes Con Malaria Grave y Malaria No complicada en Iquitos-Perú." *Rev Perú Med Exp Salud Pública* 19(3): 131-135.
- Imwong M, Pukrittayakamee S, Gruner AC, Renia L, Letourneur F, Looareesuwan S, White NJ, Snounou G. (2005). "Practical PCR Genotyping Protocols for *Plasmodium vivax* Using Pvcs and Pvmsp1." *Malar j.* 4(1): 20.
- Kain KC, Brown AE, Webster HK, Wirtz RA, Keystone JS, Rodriguez MH, Kinahan J, Rowland M, and Lanar DE. (1992a). "Circumsporozoite Genotyping of Global isolates of *Plasmodium vivax* from dried Blood Specimens." *Journal of Clinical Microbiology*: 1863-1866.
- Kain KC, Brown AE, Mirabelli L, Webster HK. (1993) "Detection of *Plasmodium vivax* by Polymerase Chain Reaction in a Field Study." *Journal of Infectious Diseases* 168: 1323-1326.
- Kain KC, Wirtz RA, Fernandez I, Franke ED, Rodriguez MH, Lanar D. (1992b). "Serologic and Genetic Characterization of *Plasmodium vivax* Whole Blood Impregnated Filter paper Discs." *Am.J. trop med Hyg* 46(4): 473-479.
- Katsnelson S, Reeder JC, Kazura JW, Patel S. (2005). "Malaria Susceptibility and Multiple Erythrocyte Polymorphisms in Papua New Guinea." *Abstrat Book. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting* 73(6): 379.
- Laurenco R, Dagama AE, Arle M, and Fernandez T. (1989). "Anopheline species, some of their habits and relation to malaria in endemic areas of Rondonia State, Amazon Region of Brazil " *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 84(4): 501-514.
- Leclerc MC, Durand P, Gauthier C, Patot S, Billotte N, Menegon M, Severini C, Ayala FJ, Renaud F. (2004). "Meager Genetic Variability of the human malaria agent *Plasmodium vivax*." *PNAS* 101(40): 14455-14460.
- Leclerc MC, Gauthier C, Villegas L, Urdaneta L. (2005). "Genetic Diversity of Merozoite Surface Protein-1 Gene of *Plasmodium vivax* Isolates in Mining Villages of Venezuela (Bolívar State)." *Acta tropica* 95(1): 26-32.
- Madhusudhan B, Aditya NP, Vageesh BN, Madhusudhan RB. (2005). "Recent Malaria Episode in Galag Village of Southern India Has Become a Cause of Concern." *Abstrat Book. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting* 73(6): 127.

- Manguin S, Roberts DR, Peyton EL, Fernandez Salas I, Barreto M, Fernandez Loayza R, Elqueta Espinola R, Martinez Granour R, Rodriguez MH. (1995). "Biochemical Systematics and Population genetic Structure of Anopheles pseudopunctipennis, Vector of Malaria in Central and South America." *Am.J. trop med Hyg* 53(4): 362-377.
- Mc Cutchan TF, Dame JB, Miller LH, Barnwell J. (1984). "Evolutionary relatedness of Plasmodium Species as Determined by the Structure of DNA." *Science* 225: 808-811.
- Mehlotra R, Mattera G, Bockarie MJ, Maguire JD, Baird JK, Sharma YD, Zimmerman PA. (2005). "Origin and Dissemination of Chloroquine-Resistant PFCRT Alleles in Papua New Guinea, Indonesia, and India." *Abstrat Book. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting* 73(6): 122.
- Mendizabal-Cabrera R, Barnwell NP. (2005). "Genetic Diversity of Plasmodium vivax in Malaria High Risk Areas of Guatemala, Central América." *Abstrat Book. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting* 73(6).
- Miller KK, Banerji A. (2004). "Epidemiology of Malaria Presenting at British Columbia's Children's Hospital." *Can J. Public Health* 95(4): 245-248.
- Ministerio de Salud (1994). "Doctrina, Normas y Procedimientos para el Control de la Malaria en el Perú."
- Mishra AK, Shukla MM, Singh N. (2005). "Epidemiology of Malaria in an Area of Stable Malaria Transmission in Central India." *Abstrat Book. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting* 73(6): 125.
- Myrick A, Sarr O, Daily T, Ndir O, Mboup S, Wirth D. (2005). "Analysis of the Genetic Diversity of the Plasmodium falciparum Multidrug Resistance Gene 5" Upstream Region." *Am.J. trop med Hyg* 72(2): 182-188
- Oficina Sanitaria Panamericana (1993). "Conferencia Ministerial sobre el Paludismo." *BOLETIN DE LA OFICINA SANITARIA PANAMERICANA* 115(3).
- Ousmane AK DS, Sango HO, Maiga MS, Mounkoro M, Sangare L, Keita N, Fane S, Mahamadou I, Traore K, Maiga AS, Maaiga MK, Diallo A, Krogstad DJ. (2005). "Effect of Seasonality on the Prevalence of the Four Malaria Parasite Species In Northern Mali." *Abstrat Book. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting* 73(6): 283.
- Parekh F, Hernandez JN, Torres K, Soto K, Sihuincha M, Davison BB, Gamboa D, Krogstad DJ, Llanos-Cuentas A, Branch OH. (2005). "Antibody responses and Malaria in Pregnant Women Living in a Hypoendemic Plasmodium vivax and P. falciparum Transmission Region of Perú." *Abstrat Book. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting* 73(6): 235.
- Picot S, Brega S, Gerome P, Velut G, De Monbrison F, Cheminel V, Peyron F. (2005). "Absence of Nucleotide polymorphism in a Plasmodium vivax Multidrug Resistance Gene after Failure of Mefloquine Prophylaxis in French Guyana." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 99(3): 234-237.
- Putaporntip C, Cui L, Udomsangpetch R, Kanbara H, Jongwutiwes S. (2005). "Polymorphism in Merozoite Surface Protein 1 of Plasmodium vivax Population in Thailand Correlates with Malaria Endemicity." *Abstrat Book. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting* 73(6): 129.
- Rajasekhar M. (2005). "Association of Malaria with Climatic Factors And Environmental

- Factors In the Biggest Pilgrim Town of South India." Abstrat Book. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting 73(6): 125.
- Rayner JC, Huger CS, Feldman D, Ingravallo P, Galinski MR, Barnwell JW. (2004). "Plasmodium vivax Merozoite surface protein PvMSP 3 beta is Radically Polymorphic Through Mutation and Large Insertions and Deletions." Infect Genet Evol 4(4): 309-319.
- Roshanravan B, Kari E, Gilman RH, Cabrera L, Lee E, Metcalfe J, Calderón M, Lescano AG, Montenegro SH, Calampa C, Vinetz J. (2003). "Endemic malaria in the Peruvian Amazon Region of Iquitos." Am.J. trop med Hyg 69(1): 45-51.
- Sa JM, Nomura T, Neves J, Baird JK, Wellems TE, Del Portillo HA. (2005). "Plasmodium vivax: Allele Variants of the mdr1 Gene o not Associate with Chloroquine Resistance Among Isolates From Brazil, Papua, and Monkey- adapted Strains." Exp. Parasitol 109(4): 256-259.
- Salas CJ, Magil AJ, Ruebush TK, Kain K, Zhong KJ, Lucas CM, Bautista C, Bacon D. (2005). "Associastion of Single Nucleotide Polymorphisms in the Dihydrofolate Reductase and Dihydrofolate Synthase Genes with Sulfadoxine-pyrimethamine (SP) resistance in Plasmodium falciparum In the Amazon Region of Perú." Abstrat Book. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting 73(6): 122.
- Santos-Cimera P. (2005). "Molecular Epidemiology of Plasmodium vivax in the State of Amazonas, Brazil" Abstrat Book. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting 73(6): 127.
- Sawyer D. (1993). "Economic and Social Consequences of Malaria in New Colonization Projects in Brazil." Soc. Sci Med 37(9): 1131-1136.
- Singh B, Cox-Singh J, Miller A, Abdullah MS, Snounou G, Rahman HA. (1996). "Detection of malaria in Malasia by nested polymerase chain Reaction Amplification of Dried blood Spots on Filter Papers." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 90: 519-521.
- Snounou G, Zhu X, Stripoon N, Jarra W, Thaithong S, Brown KN, Viriyakosol S. (1999). "Biased distribution of MSP1 and MSP2 Allelic Variants in Plasmodium falciparum Populations in Thailand." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 93: 369-374.
- Solari L, Soto A, Mendoza D, Llanos A. (2002). "Comparación de las Densidades Parasitarias en Gota G de Sangre Venosa y Digitopunción, en el Diagnóstico de Malaria Vivax." 140 Rev. Med. Hered 13(4).
- Sumawinata I. (2005). "Characterization of Malaria in Mesoendemic Area in Western Indonesia." Abstrat Book. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting 73(6): 129.
- Taylor L. (1999). "Infection rates in, and the number of Plasmodium falciparum genotypes carried by Anopheles mosquitoes in Tanzania." Annals of Tropical Medicine & Parasitology. 93(6): 659-662.
- Trenton K, Ruebush II, Zegarra J, Cairo J, Andersen E, Green M, Pilla D, Marquiño W, Huilca M, Arevalo E, Garcia C, Solary L, Kain K. (2003a). "Chloroquine- Resistant Plasmodium vivax Malaria in Perú." Am. J. Trop Med. Hyg 69(5): 548-552.
- Udhayakumar V. (2005). "Molecular Biology of Malaria Parasites & Vectors. Molecular

studies on antifolate resistance to malaria parasites in Africa " 125 Years of Malaria Research CDC. Atlanta USA: 222.

- Vargas J, Elgegren J, San Miguel A, Cardoso R. (2003). "Malaria en una Población Urbano Marginal de Iquitos." *Revista Peruana de Epidemiología* 11(1).
- Viriyakosol S, Siripoon N, Petcharapirat C, Petcharapira P, Jarra W, Thaithong S, Brown KN, Snounou G. (1999). "Genotyping of Plasmodium falciparum Isolates by the Polymerase chain Reaction and Potential Uses in Epidemiological Studies." *World Health Organization* 73(1): 85-95.
- Vittor AY, Tielsch JM, Glass G, Shields T, Sanchez-Lozano W, Pinedo V, Patz J. (2005). "The effect of Deforestation on the Human Biting Rate and Larval Breeding Sites of Anopheles Darlingi. The Primary Vector Of falciparum Malaria In The peruvian Amazon." *Abstrat Book. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting* 73(6): 151.
- Volman S, Sabeti PC, Harti DL, Birren B, Lander E, Wirth DF. (2005). "A Haplotype Map For Plasmodium falciparum." *Abstrat Book. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 54th Annual Meeting* 73(6).

ANEXOS

Consultar capítulo completo en:

http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2006/calderon_sm/pdf/caderon_tg-TH.back.2.pdf