



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
COMISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
MAESTRIA EN PARASITOLOGIA
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL**

**INFLUENCIA DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LOS *FCGR* (*CD32*, *CD16*)
EN LA INFECCIÓN POR *PLASMODIUM VIVAX*.**

Trabajo de Grado que se presenta ante la Universidad Central de Venezuela, para optar al
título de Magíster Scientiarum en Parasitología.

Rosa Naileht García León.

Caracas, mayo 2012

DEDICATORIA

Al SEÑOR JESUCRISTO por haberme dado la vida, haber guiado mis pasos y darme las fuerzas necesarias para cumplir con esta meta.

A mi familia por su incondicional apoyo y motivación.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MÉTODOS.....	36
RESULTADOS.....	55
DISCUSIÓN.....	74
REFERENCIAS.....	87
ANEXOS.....	107

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
TABLA I. Mecanismos de anemia.....	18
TABLA II. Características y principales conclusiones de los estudios de asociación entre el polimorfismo del gen <i>CD32</i> y la morbilidad de malaria por <i>Plasmodium falciparum</i>	32
TABLA III. Antimaláricos utilizados para realizar cromatografía en capa fina.....	39
TABLA IV. Iniciadores utilizados para determinar las variantes del alelo Fya.....	44
TABLA V. Iniciadores utilizados para determinar las variantes del alelo Fyb.....	45
TABLA VI. Iniciadores utilizados para determinar las variantes del alelo nulo silvestre FY.....	46
TABLA VII. Iniciadores utilizados para determinar las variantes del alelo nulo FY.....	48
TABLA VIII. Iniciadores utilizados para determinar ADN mitocondrial de <i>P.vivax</i> y <i>P.falciparum</i>	49
TABLA IX. Iniciadores utilizados para determinar las variantes del gen <i>CD32</i>	50
TABLA X. Iniciadores utilizados para determinar las variantes del gen <i>CD16</i>	52
TABLA XI. Distribución de la población según los municipios estudiados.....	55

TABLA XII. Distribución de las frecuencias fenotípicas, genotípicas y alélicas del grupo sanguíneo Duffy en individuos sanos.....	61
TABLA XIII. Detección de parásitos <i>Plasmodium (vivax y falciparum)</i> en muestras de individuos presuntamente sanos.....	63
TABLA XIV. Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg para los polimorfismos estudiados en individuos venezolanos sanos	64
TABLA XV. Frecuencias del polimorfismo NA1/NA2 del gen CD16 en individuos sanos e individuos infectados con <i>P. vivax</i>	67
TABLA XVI. Frecuencias del polimorfismo NA1/NA2 del gen CD16 en individuos sanos e individuos infectados con <i>P. vivax</i> tomando en cuenta los episodios.....	68
TABLA XVII. Frecuencias del polimorfismo NA1/NA2 del gen CD16 en individuos sanos e individuos infectados con <i>P. vivax</i> tomando en cuenta 1 episodio.....	69
TABLA XVIII. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo NA1/NA2 del gen CD16 en individuos sanos e individuos que han presentado 2 a 6 episodios de infección por <i>P. vivax</i>	70
TABLA XIX. Frecuencias del polimorfismo NA1/NA2 del gen CD16 en individuos sanos e individuos infectados con <i>P. vivax</i> tomando en cuenta 7 episodios	71
TABLA XX. Frecuencias de las combinaciones genotípica H/R131-NA1/NA2 en individuos sanos e individuos infectados con <i>P. vivax</i>	73

TABLA XXI. Estimación del porcentaje de mestizaje en diferentes poblaciones venezolanas	80
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Proyecto atlas de malaria (MAP).....	5
FIGURA 2. Ubicación Geográfica del Estado Sucre	11
FIGURA 3. Ciclo de vida de <i>Plasmodium vivax</i>	15
FIGURA 4. Mecanismos celulares dependientes de anticuerpos.....	22
FIGURA 5. Estructura de los receptores Fc γ	25
FIGURA 6. Organización genómica de los genes que codifican los receptores Fc γ	26
FIGURA 7. Visualización de la muestra de sangre en lámina portaobjeto, a.- gota gruesa y b.- extendido.....	56
FIGURA 8. Visualización del plasmodium en examen parasitológico (a.-gota gruesa y b.- extendido).....	56
FIGURA 9. Visualización de las muestras de orina en placa de aluminio recubierta con sílica gel (Merk-art 5553).....	57
FIGURA 10. Evaluación de la integridad del ADN genómico.....	58
FIGURA 11. Visualización de los productos amplificados por PCR del gen Duffy de la variante Fya, en un gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X coloreado con bromuro de etidio.....	58

FIGURA 12. Visualización de los productos amplificados por PCR del gen Duffy, variante Fyb, en un gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X coloreado con bromuro de etidio.	59
FIGURA 13. Visualización de los productos amplificados por PCR del gen Duffy, variante FY (alelo nulo, silente) en un gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X coloreado con bromuro de etidio.	59
FIGURA 14. Visualización de los productos amplificados por PCR del gen Duffy, variante FY (alelo nulo, silente en grupos étnicos negros), en un gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X coloreado con bromuro de etidio.	60
FIGURA 15. Visualización de los productos amplificados por PCR del ADN mitocondrial de <i>P. vivax</i> , en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 1X coloreado con bromuro de etidio.	62
FIGURA 16. Visualización de los productos amplificados por PCR del ADN mitocondrial de <i>P. falciparum</i> , en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 1X coloreado con bromuro de etidio.	62
FIGURA 17. Visualización de los productos amplificados por PCR de los genes CD16, variante NA1, y β -globina en un gel de agarosa al 2% en búffer TBE 1X coloreado con bromuro de etidio.	65
FIGURA 18. Visualización de los productos amplificados por PCR de los genes CD16, variante NA2, y β -globina en un gel de agarosa al 2% en búffer TBE 1X coloreado con bromuro de etidio.	66
FIGURA 19. Visualización de los productos de amplificación (PCR) de los genes <i>CD32</i> H/R ¹³¹ y <i>HGH</i> en un gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X, teñido con bromuro de etidio.	72

GLOSARIO

ALELO: Formas alternativas de un gen, debidas a variaciones en la secuencia del ADN del gen en cuestión.

GEN: En términos clásicos se define coma la unidad elemental de la herencia, la región física y funcional que controla una característica hereditaria concreta. Molecularmente se refiere a la región del genoma que contiene la información necesaria para sintetizar una molécula de polipéptido.

GENOTIPO: Constitución genética con respecto a la combinación de alelos para un gen. El término más general, es el conjunto de alelos que posee un individuo en todos sus cromosomas.

HETEROCIGOTO: Genotipo para un gen en el que ambos alelos son diferentes.

HOMOCIGOTO: Genotipo para un gen en el que ambos alelos son iguales.

LOCUS: Posición definida ocupada por un gen en ambos cromosomas homólogos (plural: loci)

POLIMORFISMO: Existencia simultánea en una población, de genomas con distintos alelos para un locus determinado. Por convenio, se dice que un locus es polimórfico cuando la variabilidad afecta a más del 1% de la población

RECAÍDA: todo caso de malaria que se presenta dentro del lapso de los 30 días siguientes a la conclusión del tratamiento antimalárico de cura radical de la infección confirmada parasitológicamente. Este episodio es debido a la reactivación de los hipnozoítos hepáticos de *P.vivax* y *P. ovale*. Hay que acotar que en las zonas de alta transmisión malarica es difícil diferenciar una recaída de un caso nuevo.

ABREVIACIONES

Ac: anticuerpos

ADCC: citotoxicidad dependiente de anticuerpo

ADCI: inhibición celular dependiente de anticuerpos

ADN: ácido desoxirribonucleico

AMPc: Adenosin monofosfato cíclico.

CD16: receptor FcγRIII

CD32: receptor FcγRIIA

CD64: receptor FcγRI

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfatos

DO: densidad óptica

EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético

EE: solución tampón Epps-EDTA.

FCGR: gen que codifica el receptor Fc gamma

FcγRs: receptores para el fragmento Fc de IgG

g.l: grados de libertad

Hb: hemoglobina

HDP: alta densidad de parasitemia

H-W: Hardy-Weinberg

IgG: inmunoglobulina G

IL-1: interleuquina 1

IL-6: interleuquina 6

IL-10: interleuquina 10

IL-11: interleuquina 11

INFγ: interferón gamma

IPA: incidencia parasitaria anual

LPA: lesión pulmonar aguda

M: Molar

MA: anemia por malaria

mg: miligramos

RESUMEN

La malaria es una enfermedad causada por la infección por diversas especies de protozoarios pertenecientes al género *Plasmodium*. La adquisición de inmunidad a parásitos de malaria sanguíneos, después de varios años de exposición continua y transmisión intensa, depende de mecanismos mediados por células y anticuerpos. Los receptores Fc son glicoproteínas expresadas en la superficie de las células del sistema inmunitario. La interacción entre anticuerpos de una clase dada y el correspondiente FcR evoca una variedad de respuestas celulares, citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, generación de radicales superóxido y liberación de citoquinas proinflamatorias. Se han descrito variantes polimórficas que incrementan la expresión o afinidad de esos receptores de IgG (FcγR), o incrementan la habilidad para unir isotipos IgG específicos, que pudiesen jugar un papel importante en determinar: inflamación y susceptibilidad a infecciones específicas. En este estudio, nosotros investigamos la asociación entre los polimorfismos y susceptibilidad a malaria causada por *Plasmodium vivax*. Las muestras de sangre periférica fueron colectadas de 147 individuos venezolanos mestizos, clasificados en pacientes con malaria (n= 93) e individuos sanos (n= 54). La técnica de PCR con iniciadores de secuencia específica (SSP) fue utilizada para establecer los polimorfismos. Las frecuencias fueron determinadas por conteo directo y la prueba exacta de Fisher fue utilizada para determinar las diferencias de frecuencias entre grupos. No se observaron diferencias en la distribución de las frecuencias de las variantes H/R131 y NA1/NA2 entre los pacientes e individuos sanos. Los resultados preliminares sugieren que el polimorfismo *FCGR* no está asociado con el desarrollo de malaria y son necesarios otros estudios para determinar el papel de los factores genéticos en esta enfermedad.

Palabras claves: polimorfismo, *Plasmodium vivax*, malaria, receptores Fc, CD32, CD16

INTRODUCCION

El paludismo o malaria es la parasitosis humana de mayor importancia desde el punto de vista médico, por su alta morbilidad, y desde el punto de vista socio-económico, por su impacto sobre los países en desarrollo, limitando el progreso y contribuyendo al subdesarrollo y la pobreza. Actualmente, se estima que el 40% de la población mundial vive en áreas de riesgo para malaria y más de 300 millones de personas la presentan en forma clínica cada año (1)

La malaria provoca entre 350 y 500 millones de casos clínicos y más de un millón de defunciones anualmente (2), y cerca de 3,2 billones de personas habitan en territorios donde se arriesgan a contraer paludismo (1). Esta enfermedad infecciosa es causada por parásitos del género *Plasmodium*, transmitidos por la picadura de mosquitos hembras del género *Anopheles*. Cinco especies del género *Plasmodium* infectan al hombre: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi* que producen fiebres tercianas maligna, terciana benigna y cuartana, respectivamente (3).

No obstante, *P. vivax* ejerce un impacto considerable sobre la longevidad y prosperidad de grandes contingentes de la humanidad, predominando en el sur de Asia, Pacífico Occidental, América del Sur, América Central y en el Mediterráneo oriental. Actualmente, se le relaciona con 80 millones de casos anuales de paludismo, que es un poco más de la mitad de la casuística global de paludismo registrada fuera de África (4).

Justificación

Tomando en cuenta que existen trabajos que asocian malaria grave o complicada por *P. falciparum* con diferentes alotipos FcRs, pero no así con *P. vivax*, y que los macrófagos y sus precursores sanguíneos, los monocitos, los cuales expresan receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas G (FcγRs), juegan un papel central en la respuesta inmunitaria, tanto innata como adquirida, y que los alotipos FcRs son determinados genéticamente, es importante estudiar la variabilidad de los genes *FCRG* y su posible papel en la susceptibilidad y/o resistencia a la malaria por *P. vivax*. En el humano existen 3 clases de receptores para la porción Fc de la IgG (FcγR): CD64 (FcγRI), CD32 (FcγRII) y CD16 (FcγRIII), los cuales difieren en su estructura, afinidad de unión por la IgG y propiedades de señalización en la célula. Estos receptores, una vez que interaccionan con los complejos inmunitarios, son capaces de disparar funciones efectoras, tales como, fagocitosis en monocitos/macrófagos, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo en células

citotóxicas naturales (NK: natural killer), activación de neutrófilos e inhibición de la activación de células B mediada por complejos inmunitarios (5)

Planteamiento del problema

Considerando que la variabilidad de los genes *CD32* y *CD16* afecta las funciones efectoras que éstos disparan al interaccionar con sus ligandos (Inmunoglobulinas G), estimulando una gran variedad de respuestas importantes en los mecanismos de defensa contra la malaria, nos planteamos el siguiente problema: ¿existirá una posible asociación entre las variantes de los genes *CD32 (FcγRII)* y *CD16 (FcγRIII)* con susceptibilidad y/o resistencia a la infección por *P. vivax*? Para dar respuesta a nuestro planteamiento realizamos un estudio observacional de corte transversal.

Marco teórico

Las distintas especies de plasmodios en América no sólo tienen un origen distinto, sino que han encontrado un gran espectro de especies de anofelinos susceptibles, desde los Estados Unidos de Norteamérica hasta el norte de Argentina, conjuntamente con el hecho de afectar al continente Americano, el más heterogéneo desde el punto de vista genético, al estar conformado por etnias amerindias (indo-asiáticas), caucásicas-mediterráneas y negro-africana. En contraste, en el continente africano la larga co-evolución de los parásitos maláricos con una población étnicamente más homogénea, ha permitido la inducción y expresión de fenotipos condicionantes de resistencia a la infección por estos hemoparásitos (hemoglobinopatías, tales como la presencia de hemoglobina S, enzimopatías como la deficiencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, ausencia del grupo Duffy, mutaciones como la de la banda 3 que ocasiona ovaloalosis). En otras palabras, los parásitos maláricos han actuado como una fuerza selectiva, la cual si bien favoreció la aparición de genes perjudiciales, éstos, le han dado ventaja selectiva a las poblaciones de origen africano. (6). La ausencia del grupo Duffy, receptor eritrocítico de los merozoitos de *P. vivax* ha limitado la dispersión de esta especie en África, al contrario de lo ocurrido en el continente americano (6). La malaria existe en la mayor parte de las regiones tropicales del mundo. *Plasmodium falciparum* predomina en África, Nueva Guinea y Haití, mientras que *P. vivax*

es más frecuente en América Central y el Subcontinente Indio. La prevalencia de estas dos

especies es aproximadamente similar en América del Sur, Asia Oriental y Oceanía. *P. malariae* se encuentra en la mayor parte de las áreas endémicas, especialmente en toda el África subsahariana, aunque su frecuencia es mucho menor que la de las otras especies mencionadas. *P. ovale* es relativamente infrecuente fuera de África y donde se observa, representa menos del 1% de los casos (7).

La malaria causa unos 400–900 millones de casos de fiebre y aproximadamente 1-3 millones de muertes anualmente (8), lo que representa una muerte cada 30 segundos. La vasta mayoría de casos ocurren en niños menores de 5 años (9). A pesar de los esfuerzos de reducir la transmisión e incrementar el tratamiento, ha habido muy poco cambio en áreas que se encuentran en riesgo de la enfermedad desde 1992 (1). De hecho, si la prevalencia de la malaria continúa en su curso de permanente aumento, la tasa de mortalidad puede duplicarse en los siguientes veinte años (8). Las estadísticas precisas son desconocidas, porque muchos casos ocurren en áreas rurales donde las personas no tienen acceso a hospitales o a recursos para garantizar cuidados de salud. Como consecuencia, la mayoría de los casos permanecen indocumentados (8).

La disminución del paludismo registrada en Zambia fue particularmente marcada cuando 3,6 millones de mosquiteros e insecticidas de larga duración se distribuyeron entre los años 2006 y 2008. Durante este periodo, la mortalidad por paludismo descendió un 47% y las encuestas nacionales indicaban que la prevalencia del parásito disminuyó en 53%, de 21,8% a 10,2%, y el porcentaje de niños con anemia grave, causada por la malaria, se redujo en 68%, del 13,3% al 4,3% (10).

En el año 2009 se ha presentado el mapa más completo y exhaustivo sobre la presencia del paludismo en el mundo, los científicos y las organizaciones tienen al alcance una herramienta muy útil para saber dónde y cómo llevar a cabo los proyectos para controlar la enfermedad. Según este atlas, (figura 1) el área global de riesgo estable de *P. falciparum* fue de 29,73 millones de kilómetros cuadrados, distribuidos entre América (el 20,30% de la extensión), la zona denominada África plus (+), que incluye África, Yemen y Arabia Saudí (con el 61,10% del área), y Asia Central y el Sudeste Asiático (18,60%) (11)



Figura 1: Proyecto atlas de malaria (MAP). (Hay SI, *et al.*, 2009.) (11)

La malaria en Venezuela

En los años treinta, la malaria en Venezuela llegó a afectar un tercio de la población. Sin embargo, en 1936 al crearse la Dirección Nacional de Malariología y Saneamiento Ambiental, el Dr. Arnoldo Gabaldón y su equipo logró con diferentes acciones erradicar la Malaria en 460.397 Km² del territorio nacional (12). Desde 1985, las zonas con mayor incidencia malárica del país han sido los Estados Bolívar y Sucre, seguidos de Amazonas, Delta Amacuro y Apure, con algunas excepciones. Esto representa en la actualidad un 20% del territorio venezolano con una población cercana al millón de habitantes o en otras palabras, 5% de la población que vive en áreas ecológicamente aptas para la transmisión (13, 14). Actualmente, la transmisión malárica en Venezuela se localiza en tres focos: el

foco oriental representado por los estados Monagas, Sucre, Anzoátegui y la parte occidental de Delta Amacuro, el foco occidental que incluye los estados Barinas, Mérida, Portuguesa, la parte occidental de Apure, Yaracuy, Zulia, Trujillo y Táchira y el foco meridional conformado por los estados Bolívar, Amazonas y parte oriental de Apure y Delta Amacuro, este último presenta el índice parasitario anual más elevado. En Venezuela se han señalado 36 especies de mosquitos del género *Anopheles*. Las especies *A. meigen* (15), *A. (Nyssorhynchus) darlingi*, *A. (Nys.) aquasalis*, *A. (Nys.) nuñeztovari* y *A. (Nys.) marajoara* han sido involucradas como vectores principales, mientras que otras especies pudiesen actuar como vectores potenciales (16). Además, en Centro y Sur América el *Anopheles albimanus* se considera un vector primario de malaria (17). Todas estas especies se encuentran adaptadas a uno o más de los diversos ambientes presentes en el país que abarcan llanos, montañas, bosques húmedos tropicales y zonas costeras (16).

En la historia malárica nacional, se observa que los grandes incrementos de los casos se han debido fundamentalmente a movimientos poblacionales en zonas de difícil acceso. Estas epidemias se han debido a incrementos en la morbilidad, principalmente en el estado Bolívar, zona habitada por criollos e indígenas, con diferentes accesos a servicios de salud. La principal actividad económica es la minera (legal y/o ilegal) y en menor escala actividades agrícolas limitadas, contribuyendo con la migración durante la recolección de las cosechas. Este grupo de variables en conjunto con las condiciones eco-sistémicas crean un escenario epidemiológico complejo para el control de la malaria (13)

Situación actual de la malaria en Venezuela

En el año 1990 se notificaron 46.910 casos con un IPA de 237,7 por 100.000 habitantes, lográndose en el año 1993 disminuir a 12.603 casos con una tasa de 59,7 por 100.000 habitantes. En los años siguientes se presentaron variaciones y en el 2004 un aumento considerable de 46.244 casos, con un IPA de 177,0 por 100.000 habitantes, casi alcanzando el número de casos presentados en 1990 (18). En el 2008 disminuyeron los casos a 32.037, con un IPA de 180 por 100.000 habitantes. Pero, en el año 2009 se reportaron 35.725 casos de malaria de los cuales 99,38% (35.505 casos) fueron

diagnosticados en los estados Amazonas, Bolívar, Delta Amacuro, Sucre y Anzoátegui (Reporte epidemiológico semanal, semana 52, 2009), siendo la fórmula parasitaria de 75,4% para *P. vivax*, 21,6% para *P. falciparum* y 2,9% para infecciones mixtas *P. vivax* +

P. falciparum. Sin embargo, al final del primer trimestre del año 2010 se registraron en el país 12.717 casos de malaria, muy por encima de los 4.917 del primer trimestre de 2009, según se desprende del boletín epidemiológico semanal (19). Incrementándose un 138 por ciento los casos de malaria en el estado Bolívar, en comparación con el mismo período del año anterior (20). Asimismo, el Boletín Epidemiológico Semanal del Ministerio de Poder Popular para la Salud notifica que hasta la semana N° 14 del 2010, existe un acumulativo de 14.075 casos, lo que representa un aumento de 78,4% con respecto al mismo período del año anterior (n=7.891) (19). Durante esa semana se diagnosticaron 1.380 casos de Malaria en el país, 1.358 autóctonos (98,4%) y 22 casos (1,6%) importados del exterior (Guyana n= 10, Colombia n=8 y Haití n=4), reportados desde los estados Zulia, Táchira, Amazonas, Bolívar, Carabobo y Distrito Capital. Siendo, la fórmula parasitaria de 70,4% para *Plasmodium vivax*, 25,8% para *Plasmodium falciparum*, 0,1% para *Plasmodium malariae* y 3,6% infecciones mixtas (*P. vivax* + *P. falciparum*). El 65,2% de los casos ocurren en el sexo masculino (n=885), siendo la población más afectada aquella con edades comprendidas entre 10-39 años (62,03%). Los estados Bolívar, Amazonas y Delta Amacuro, reportaron 99% de la casuística nacional (n=1.061, n=269 y n=15 respectivamente) (19).

La situación es bastante preocupante en el estado Bolívar, porque entre el 1 de enero y el 3 de abril de 2010, ha concentrado 92% de los casos de paludismo que se registraron en todo el país. Siendo, los municipios más afectados Sifontes Cedeño, Gran Sabana y Angostura y la fórmula parasitaria la siguiente: *Plasmodium vivax*: 67.4%, *Plasmodium falciparum*: 25 % y mixta: 4.7% (19)

Para la semana N° 15 del 2010, según el Boletín regional de Salud ambiental del Estado Bolívar se registraron 936 casos, con un acumulado hasta esa semana de 13.039, en comparación con el acumulado a la semana homóloga del año 2009, que fue de 5.391, lo cual representa un aumento de 141.8% (21). Durante la semana epidemiológica N° 15 del 2010, los 24 estados, realizaron la respectiva notificación semanal obligatoria de casos, con el registro de 5.644 muestras tomadas y el diagnóstico de 716 casos en el país, 697 autóctonos (97,3%) y 19 casos (2,7%) importados del exterior (Guyana n=13 y Colombia n=6), reportados desde los estados Amazonas, Bolívar y Dtto. Capital (63,16% son infecciones a *P.vivax* y 36,84% *P.falciparum*). La fórmula parasitaria es 79,6% a *Plasmodium vivax*, 15,8% a *Plasmodium falciparum*, 0% a *Plasmodium malariae* y 4,6%

Infecciones Mixtas (*P. vivax* + *P. falciparum*). El 66,7% de los casos se presentaron en el sexo masculino ($n=465$) y la población entre 10-39 años es la más afectada (64,13%) (22)

Además, los municipios con mayor Incidencia Parasitaria Anual (IPA) son: Sifontes (Bol) (667,7), Gran Sabana (Bol) (73,6), Sucre (Bol) (46,8), Atures (Ama) (36), Pedernales (Del) (28,1), Piar (Bol) (23,2) y Raúl Leoni (Bol) (20,8). Del total de casos reportados, 83,4% ($n=704$) son atribuibles a 7 parroquias del país: San Isidro (Bol) ($n=327$), Dalla Costa (Bol) ($n=137$), Tumeremo (Bol) ($n=78$), Ikabarú (Bol) ($n=51$), Pedro Cova (Bol) ($n=50$), Platanillal (Ama) ($n=41$), Parhueña (Ama) ($n=20$).

Hasta la fecha existe un acumulativo de 13.372 casos, lo que representa aumento de 9,9% con respecto al período homólogo del año anterior ($n=12.172$). La Incidencia Parasitaria Anual (IPA) del país es de 8,1 por cada 1.000 habitantes. El porcentaje de láminas tomadas durante el año con respecto a la población bajo vigilancia (IAES) es de 6,8%. El Índice de Láminas Positivas acumulativo (ILP) es de 12,21% (22)

Causas del incremento de la malaria en Venezuela

Las causas del incremento de la malaria son multifactoriales, las siguientes causas han sido reconocidas en documentos técnicos oficiales de nuestro país, como el Plan Nacional sobre el control de los vectores de dengue, malaria y Chagas (Diciembre de 2009)

1. Insuficiente personal profesional, técnico y operativo con formación en el área malárica.
2. Periodicidad anual de la transmisión malárica asociada con la entrada y salida de las lluvias, asociada a los fenómenos ambientales naturales (vaguadas, vientos huracanados y tormentas tropicales), que condicionan un incremento de la densidad poblacional de los vectores, cambios en el hábitat de los anofelinos, incrementando la transmisión de la enfermedad.
3. Elevado desplazamiento de la población hacia áreas de exploración y explotación minera de difícil acceso.
4. Actividades de vigilancia epidemiológica incompletas y evaluaciones inconsistentes, con incumplimiento de los planes de trabajo en el ámbito regional.

5. Deterioro generalizado del parque de vehículos a motor (terrestre y fluvial), que conforman las cuadrillas para la vigilancia, prevención y control de la malaria.
6. Ausencia de la ejecución del Programa de Promoción y Educación para la Salud Ambiental en las áreas de transmisión, así como la falta de incorporación de los habitantes en el marco de las líneas de corresponsabilidad implementadas en el Plan Nacional de Desarrollo Económico y Social de la Nación “Proyecto Nacional Simón Bolívar”, año 2007-2013.
7. Falta de supervisiones técnicas a todos los niveles por la insuficiencia del personal profesional, técnico y operativo.
8. Fallas en el cumplimiento de la pauta nacional de administración y dosificación de los tratamientos antimaláricos.
9. Alta trashumancia en el área fronteriza, el documento no presenta información adicional a que se refiere

Como podemos observar las causas que explican el incremento de los casos de malaria en nuestro país son diversas, si bien es cierto que las asociadas a cambios climáticos, presencia de zonas inaccesible en algunos estados y movilidad poblacional son difíciles de controlar (causas 1, 2 y 9) , el resto traduce fallas institucionales y organizacionales del sistema público de salud: la ineficiencia de un plan articulado de vigilancia epidemiológica para el control de la enfermedad, insuficiente personal profesional, técnico y operativo con formación en el área malárica, incumplimiento de la pauta nacional de administración y dosificación de los tratamientos antimaláricos y la falta de asignación de recursos para ejecutar el plan, entre otras.

Malaria en Sucre

Las enfermedades metaxénicas (trasmitidas por vectores), como la malaria, son sistemas complejos, en donde las variables ambientales operan sinérgicamente afectando su dinámica. Dentro de estas variables, el clima con sus componentes: precipitación, temperatura y humedad, constituyen elementos importantes en la caracterización y modelado de este problema de salud pública. Los cambios en los niveles de precipitación, temperatura y humedad afectan el ciclo de vida del vector, acortando su desarrollo e

incrementando la población de adultos. En el estado Sucre (Figura 2), localizado a los $10^{\circ}02'38''\text{N} - 10^{\circ}45'30''\text{N}$, $61^{\circ}50'48''\text{W} - 61^{\circ}31'47''\text{W}$, en la región nororiental de Venezuela (23, 24), se viene estudiando la caracterización de la dinámica de la malaria, encontrándose importantes evidencias de relaciones entre los fenómenos vinculados a la variabilidad climática y la epidemiología, con base a los casos de malaria, las variables climatológicas (precipitación y temperatura) y los indicadores de variabilidad climática (el fenómeno El Niño-Oscilación del Sur (ENSO)). Otras variables ambientales (altitud, pendiente, topografía, etc.) tienen un efecto modificador, contribuyendo con la heterogeneidad climática del estado. Esto se traduce en una respuesta epidemiológica espacialmente diferenciada, la cual se debe considerar para evaluar tanto el impacto de la variabilidad climática sobre la enfermedad como para el diseño de planes de prevención y control (25)

Figura 2: Ubicación Geográfica del Estado Sucre (Delgado *et al.*, 2007) (25)

La infección por *P. vivax* sigue siendo una forma de malaria poco estudiada, sin embargo, el estudio titulado: “Malaria por *Plasmodium vivax* en adultos hospitalizados en Carúpano estado Sucre 2000-2002”, refleja parte de lo que actualmente sucede con ésta entidad. En Sucre la malaria sigue siendo la infección parasitaria más importante y de las primeras entidades en la lista de morbilidad. Por lo tanto, todos los esfuerzos podrán contribuir a su control, alcanzado en el último año y que debe consolidarse en los próximos

años, por lo cual el clínico debe conocer los principales aspectos de su diagnóstico, tratamiento y prevención (26).

Desde el punto de vista eco-epidemiológico, el estado Sucre es una entidad de gran importancia porque ha ocupado, en varias oportunidades, el primer lugar en cuanto a intensidad malárica y por poseer una alta heterogeneidad espacial, que hace que la expresión de la enfermedad sea diferenciada (23, 24, 27).

Ciclo de vida

Los parásitos causantes de la malaria son protozoarios pertenecientes a la Familia Plasmodiidae, Phylum Apicomplexa, Clase Sporozoea (28). Esta familia comprende varios parásitos intracelulares que se encuentran en la sangre de reptiles, aves y mamíferos (29, 30). Dentro de esta familia, el género *Plasmodium* se encuentra dividido en 10 subgéneros que agrupan a varias decenas de especies (29), de las cuales sólo cinco afectan al hombre (29).

Existen dos etapas del ciclo, uno que se desarrolla en el mosquito, llamado ciclo esporogónico, en el cual hay reproducción sexual y otro que se desarrolla en el vertebrado, con reproducción asexual, llamado ciclo esquizogónico (31).

El ciclo de vida de este parásito atraviesa varias etapas de desarrollo en el hospedador vertebrado (etapas asexuales exo-eritocíticas e intraeritrocíticas y gametocitos) y otras más en el invertebrado (gametos, cigoto, oocisto, oocineto y esporozoítos) (32).

El ciclo de vida del *Plasmodium vivax* se describe en la Figura 3. El ciclo comienza cuando una hembra de mosquito *Anopheles* pica a una persona con malaria al ingerir sangre que tenga los parásitos sexualmente diferenciados en machos y hembras, llamados microgametocitos y macrogametocitos, respectivamente (a). En el tracto digestivo del mosquito, los gametos se diferencian. El microgametocito, al escapar de la célula hospedera y en presencia de los elementos macromoleculares precursores adecuados, sufre rápidos cambios nucleares y citoplasmáticos que dan origen a ocho anoxemas que promueven en el microgametocito el proceso de exflagelación (33). Este proceso ocurre durante los 8 a 10 minutos siguientes a la ruptura del eritrocito y está acompañado de tres divisiones endomitóticas sucesivas, precedida de una muy rápida replicación del genoma. De esta manera se originan ocho microgametos en forma de flagelo, cada uno con una carga genómica haploide completa, los cuales se desprenden del cuerpo celular y desplazan activamente en busca de un microgameto dentro del contenido estomacal del mosquito. Cada macrogametocito al salir del eritrocito hospedero, sufre un

proceso de maduración que puede durar varias horas, que conlleva a una serie de cambios moleculares, la mayoría de ellos indetectables, lo cual da origen a un macrogameto. No obstante, el macrogameto puede ser fecundado a los pocos minutos de su formación (33) (b). Inmediatamente después de la gametogénesis ocurre la fecundación que tiene lugar cuando un microgameto encuentra un macrogameto y lo fecunda. La fertilización comienza con la fusión de los núcleos de ambos gametocitos y usualmente es completada dentro de la primera hora de desarrollo dentro del estómago del mosquito. Como resultado de la fecundación se forma un huevo o cigoto diploide móvil y vermiforme llamado oocineto. Durante este período, en un lapso de 5 a 9 horas, ocurre la primera y segunda división meiótica del genoma diploide (33). El oocineto se traslada activamente hasta el epitelio estomacal del mosquito y lo traspasa para enquistarse en la cara externa del estómago por debajo de la lámina basal, protegido del contacto directo con el hemocele, dando inicio a la fase de ooquiste. El proceso desde el momento de la fecundación hasta el momento en que el oocineto se enquista en el hemocele del mosquito, ocupa un lapso de tiempo variable, que puede durar aproximadamente de 12 a 36 horas dependiendo de la especie del mosquito y plasmodio involucradas, ya que este es un proceso altamente especie-específico. (34) (c). Los macrogametocitos maduran y se transforman en macrogametos, en cada uno de éstos se forman 1-2 cuerpos polares que se mueven a la superficie del parásito para recibir un microgameto que lo fecunda. Ocurre así la fusión de sus cromatinas, para conformar el huevo o cigoto. Este se transforma en una célula alargada y móvil, de aproximadamente 20 micras de longitud, llamada ooquineto, la cual penetra la pared del estómago del mosquito y se coloca entre las capas epitelial y muscular. Allí crece y se forma el ooquiste que es redondeado, el cual al llegar a su madurez alcanza un tamaño aproximado de 50 micras. En su interior ocurre la división del núcleo y el citoplasma para constituir gran cantidad de elementos filamentosos llamados esporozoítos y se disemina por todo el cuerpo del mosquito, pero se localizan preferentemente en las glándulas salivares, donde permanecen hasta ser inoculados durante una nueva picadura (31) (d). A partir de los cigotos se desarrollan estructuras multinucleadas llamadas oocistos (e) que, en unos pocos días, se dividen en miles de células fusiformes muy pequeñas, los esporozoítos (f). Éstos luego migran a las glándulas salivales del mosquito. Cuando la hembra pica a otra persona la infecta con los esporozoítos (g). Éstos primero entran a las células hepáticas (h), donde sufren divisiones múltiples (i). Los productos de estas divisiones (merozoítos) entran a los glóbulos rojos (j), donde nuevamente se dividen en forma repetida (k), rompen los glóbulos rojos (l) a intervalos regulares de

aproximadamente 48 horas; así, provocan episodios febriles recurrentes que son característicos de esta enfermedad. Después de un período de reproducción asexual, parte de los merozoítos se transforman en gametos indiferenciados (m) y, si son ingeridos por un mosquito en este estadio, el ciclo comienza nuevamente (35).

Las características de *P. vivax* en cuanto a las recaídas y períodos de incubación influyen notablemente en la morbilidad del paludismo por este *Plasmodium*, pues su tratamiento exige fármacos con acción curativa radical, es decir con efecto sobre las formas tisulares persistentes (hipnozoitos) y preventivos de las recaídas que aquellas originan (29). La recaída se define como aquella infección confirmada parasitológicamente en el período de 120 días después de la última infección reportada como caso nuevo de *P.vivax*. El paludismo por *P. vivax* cursa con un período primario de incubación de 12 a 17 días, aunque hay reportes (29) de infecciones que ocurrían en el norte de Rusia con períodos primarios de incubación de nueve meses o más. Superado el primer episodio por efectos de un tratamiento adecuado o por la inmunidad del individuo, es común que la actividad clínica reaparezca al término de 8-10 semanas después del ataque primario, provocando las llamadas recaídas a corto plazo, o a las 30-40 semanas siguientes al ataque primario, dando lugar a las recaídas a largo plazo (36). Las recaídas a corto plazo, predominan en los trópicos y las de largo plazo son propias de las infecciones adquiridas en los climas templados (37,38, 39). Estas recidivas se originan a partir de esporozoitos que no acometen la esquizogonia hepática inmediatamente después de la invasión del hepatocito, sino que por razones todavía desconocidas frenan su desarrollo y adoptan una fase adormecida o hipnozoito (40,41), que persiste en el hígado durante varias semanas, meses o años. Tampoco se conoce el estímulo por el cual el parásito despierta de este letargo y reasume la esquizogonia tisular, con su secuela de nuevos episodios mórbidos (40,41).

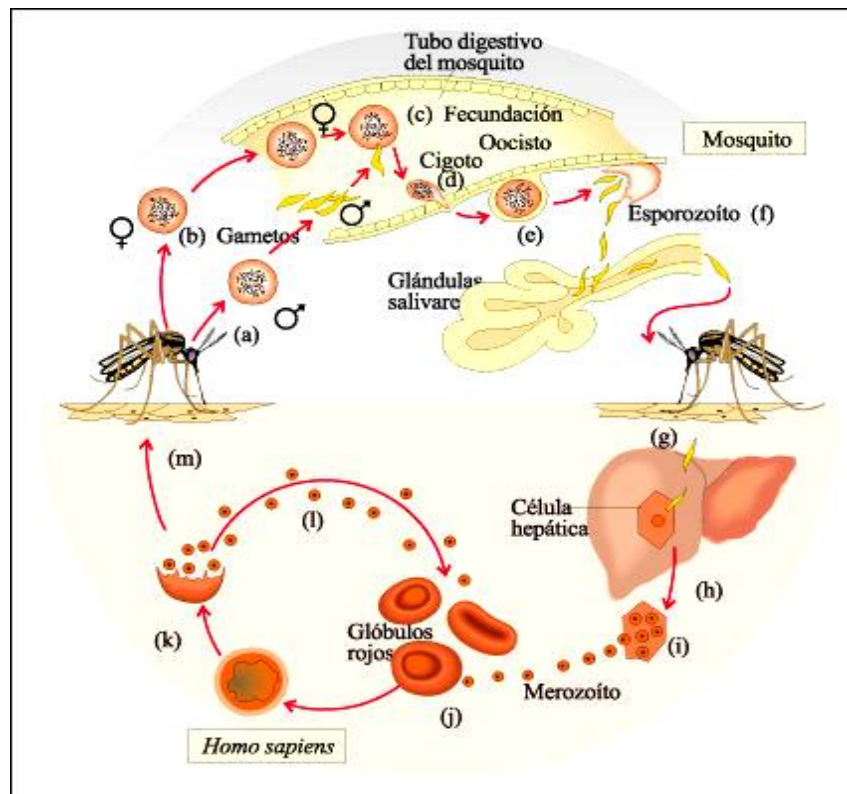


Figura 3. Ciclo de vida de *Plasmodium vivax*. (Curtis *et al.*, 2001.) (35)

Manifestaciones clínicas

La gravedad de las manifestaciones clínicas depende de la especie de *Plasmodium*, de la densidad parasitaria y el grado de inmunidad del hospedero, pudiendo ir desde un cuadro asintomático, una simple fiebre hasta una falla de múltiples órganos.

Paludismo primario

Aparece en pacientes sin exposición previa, el período de incubación va desde 7 días hasta meses según la especie de *Plasmodium*. El período de invasión está marcado por fiebre progresiva con picos de 39 a 40°C, mialgias cefaleas, náuseas, vómitos y dolor abdominal, en ocasiones diarrea, lo que puede confundirse con gastroenteritis o con cuadro viral.

Crisis palúdica.

Aparece algunos días después de terminada la forma primaria, se manifiesta por escalofrío, fiebre elevada, taquicardia, vómitos, esplenomegalia, hipotensión arterial. Todo ello seguido de una fase de calor en la que la temperatura llega a 40°C incluso 41°C y la piel se seca, dominando la eritrodermia. Posteriormente presenta sudoración profusa y la tensión

se recupera. El ritmo de los accesos se repite según la literatura clásica cada 2 días (*P. vivax*, *P. Ovale*, *P. falciparum*: fiebre terciana) o cada 3 días (*P. malariae*: fiebre cuartana)

Manifestaciones clínicas en la infección por *P. vivax*

En las infecciones por *Plasmodium vivax* se producen periódicamente, cada 48 horas, el paroxismo malárico que se caracteriza por: fiebre elevada, escalofríos y sudoración. Esta presentación constituye la tríada característica de la malaria aguda (42). El paroxismo malárico es precedido por la ruptura sincrónica de glóbulos rojos infectados por esquizontes. Esta ruptura expone material del parásito al sistema inmune y otros sistemas fisiológicos del hospedero. La fiebre es una característica que está casi siempre presente durante un paroxismo. En el paroxismo típico en malaria por *P. vivax* de individuos no-inmunes, el primer síntoma son los escalofríos, que duran hasta una hora. La aparición de escalofríos es seguida por el inicio de la rigurosidad, con violentos temblores y castañetear de los dientes, que también podrían continuar durante aproximadamente una hora. Durante este período, la temperatura corporal aumenta, alcanzando los valores máximos de hasta ~ 41°C, dentro de la primera o segunda hora después de la aparición de los escalofríos. En el próximo período, el individuo experimenta malestar. Dentro de una hora, sin embargo, la temperatura comienza a disminuir y se acompaña de abundante sudoración. En comparación con el rápido aumento de la temperatura, al inicio de un paroxismo de *P. vivax*, su declive tiene lugar lentamente a lo largo de varias horas, la temperatura normal empieza a restaurarse generalmente entre cinco y siete horas después de la aparición de los escalofríos. Estos síntomas de un paroxismo pueden ir acompañados de otros, incluyendo dolor de cabeza, náuseas, vómitos y dolores musculares, articulares y de espalda, de moderados a graves. (43)

Al examen clínico, los pacientes presentan, esplenomegalia moderada y hepatomegalia dolorosa. Ya establecida la enfermedad, la esplenomegalia se presenta en un 80% de los pacientes y por súbita distensión de la cápsula puede producir ruptura espontánea, especialmente en paludismo por *P. vivax*. (42). La esplenomegalia es muy frecuente en personas que viven en zonas de paludismo endémico y es el reflejo de infecciones repetidas, sin embargo, en las personas con paludismo el bazo tarda varios días en hacerse palpable (7). El agrandamiento del bazo es parte de la reacción general del cuerpo a las infecciones repetidas. Si estas infecciones son muy espaciadas una de otras, el bazo puede regresar a su tamaño normal o por lo menos quedar demasiado pequeño para ser palpable en estos intervalos. (44)

Con respecto a los hallazgos hematológicos, la anemia es la más frecuente. No obstante, en la génesis de este problema están involucrados varios mecanismos (Tabla I). Además de la anemia, la trombocitopenia es la anormalidad hematológica más frecuente, reportada en pacientes con malaria por *P. vivax*. Oh MD *et al.*, reportaron que la trombocitopenia era la anormalidad de laboratorio más frecuente en pacientes Coreanos con malaria por *P. vivax*, observándose en 85.1% de los pacientes. Además, reportaron la presencia de trombocitopenia severa (60,000 plaquetas/L) en 29,6% de los pacientes. A pesar de la trombocitopenia severa, los perfiles de coagulación eran generalmente normales en los pacientes y el sangrado clínico no se observó (39). Los mecanismos de trombocitopenia en malaria por *P. vivax* son pobremente entendidos, pero recientes estudios han sugerido que niveles elevados de inmunoglobulina G asociada a plaquetas (PAIgG) y el factor estimulante de colonia de macrófagos están asociados con trombocitopenia (39). Los complejos inmunes que están presentes en la circulación de pacientes con malaria pueden jugar un papel en la destrucción periférica de plaquetas, así como de glóbulos rojos. Kelton *et al.*, reportaron que la trombocitopenia estaba presente en 17 de 28 pacientes con malaria, y los niveles de PAIgG estaban incrementados en 16 casos, además, demostraron que los niveles de PAIgG y el conteo de plaqueta retornaba a valores normales cuando los parásitos eran eliminados de circulación. (45). Yamaguchi *et al.*, reportaron, que en malaria por *P. vivax*, la trombocitopenia y un incremento de PAIgG estaban estrechamente asociados, y se presentan antes de la detección de anticuerpos antimaláricos (46). Finalmente, los posibles mecanismos que guían a trombocitopenia en malaria han sido discutidos, los cuales incluyen mecanismos inmunes, estrés oxidativo, alteraciones en las funciones esplénicas y una interacción directa entre los parásitos *Plasmodium* y plaquetas (47)

Tabla I

MECANISMOS DE ANEMIA

1. Hemolisis: Ruptura de esquizontes
 2. Eritropoyesis Inefectiva
 3. Eritrofagocitosis Incrementada
 4. Hemolisis Inmune: De hematíes normales
y parasitados
-

Perrin *et al.*,1982 (48)

Aunque la enfermedad de malaria por *P. vivax* ha sido calificada como "benigna", los síntomas son a menudo graves y debilitantes (49). Recientemente, se ha demostrado que el *P. vivax* causa síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) / edema pulmonar no-cardiogénico, enfermedad que se pensaba se producía sólo en la malaria causada por *P. falciparum* (50). La lesión pulmonar aguda (LPA)/Síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) en malaria es poco común, sin embargo, produce una alta mortalidad (51). En la malaria por *P.vivax*, el compromiso pulmonar y su severidad dependen de la interrelación del parásito con la inmunidad del hospedero, ya que la respuesta inmunitaria celular del hospedador se dirige contra antígenos del parásito, pero en lugar de controlar el daño local causa mayores lesiones orgánicas (52).

Inmunidad en malaria

La respuesta innata a la malaria ha recibido relativamente poca atención. Sin embargo, se está considerando, cada vez más la función protectora de los mecanismos de inmunidad innata y su papel en la inducción de la inmunidad adaptativa, justificando así los estudios de la inmunidad innata en la malaria (53)

La inducción rápida de monocinas y linfocinas (como la IL-12, IFN- γ y el TNF- α) puede permitir que el hospedero infectado controle de manera efectiva la replicación exponencial de los parásitos en el estadio de sangre hasta que la respuesta inmune adaptativa pueda tener lugar. Esto podría ser de mayor beneficio durante la infección primaria, pero, dado el grado de polimorfismo antigénico de los parásitos de malaria, la

respuesta innata también puede ser necesaria para controlar las re-infecciones de variantes genotípicas hasta que nuevas respuestas adaptativas sean generadas (53).

No obstante, considerando que muchos de los antígenos de superficie de los parásitos de malaria y las proteínas de los parásitos insertadas en la membrana plasmática de los glóbulos rojos infectados son polimórficos o exhiben variación antigénica clonal, se ha propuesto la necesidad de desarrollar un repertorio diverso de anticuerpos capaces de bloquear la invasión parasitaria y la adhesión tisular, a fin de lograr una inmunidad antiparasitaria eficaz. La infección con una variante parasitaria que no es reconocida por el repertorio de anticuerpos existentes, puede conducir a una replicación parasitaria no controlada y, por lo tanto, a la patología. La adquisición gradual de inmunidad clínica (después de repetidas infecciones) y el desarrollo de un repertorio de anticuerpos diversos pueden ser causalmente unidas. Estos anticuerpos malaria específicos median un número de funciones antiparasitarias efectoras, incluyendo inhibición de citoadherencia, inhibición de invasión eritrocítica, citotoxicidad dependiente de anticuerpo e inhibición celular.

Estudios en ratones y seres humanos han demostrado, repetidamente, que las citocinas proinflamatorias, especialmente IL-12, IFN-gamma, y el TNF-alfa, son mediadores esenciales en la inmunidad protectora a malaria eritrocítica (53). Estas citocinas pueden derivar tanto de la respuesta inmune innata como adaptativa y debido a que desempeñan un papel tanto en la inmunidad y la patología de la malaria, se ha dado importancia a cuantificar la contribución relativa de estos dos componentes de la respuesta inmune a la respuesta proinflamatoria. El TNF-alfa y el IFN-gamma actúan de forma sinérgica para optimizar la producción de óxido nítrico (NO), que está implicado en la muerte del parásito. Del mismo modo, en humanos, la producción de TNF-alfa en plasma y los niveles de óxido nítrico están asociados con la resolución de la fiebre y la eliminación del parásito, mientras que el TNF-alfa e IFN-gamma plasmáticos median la pérdida de infectividad de los gametocitos circulantes (53).

Artavanis-Tsakonas K. *et al.*, sugieren que las células citotóxicas naturales (NK) son una fuente importante de IFN- γ en las primeras horas de una infección por malaria y, por lo tanto, puede ser un componente importante en la defensa innata contra la parasitemia palúdica. Sorprendentemente, esta respuesta innata no es universal entre los individuos, planteando interrogantes interesantes acerca de la importancia funcional de la respuesta innata en la infección por malaria (53). Dos hipótesis opuestas se han propuesto: la rápida producción de IFN- γ puede estar asociada con la inducción eficiente de IFN- γ mediada por mecanismos efectoras, incrementando la capacidad para controlar las

infecciones de malaria. Alternativamente, la producción rápida e innata de IFN- γ puede predisponer a la sobreproducción de citoquinas inflamatorias y aumentar el riesgo a desarrollar malaria severa. Sin embargo, estas hipótesis deben ser esclarecidas por estudios en áreas endémicas de malaria (53).

Los mecanismos inmunes efectores mediados por células, incluyen la activación de macrófagos por células NK o interferón γ (IFN- γ) derivado de células T $\gamma\delta$ o Th1, aumentando la fagocitosis y muerte de los eritrocitos parasitados y la inhibición de crecimiento y desarrollo del parásito dentro de los hepatocitos, por células T citotóxicas CD8⁺ y productoras de IFN- γ . Además, el óxido nítrico (NO) producido por los macrófagos en respuesta a los parásitos y la producción de IFN- γ por células T puede tener efectos antiparasitarios. (54)

Previamente se han realizado investigaciones sobre los acontecimientos relacionados con paroxismos en infecciones por *P. vivax*, incluyendo la inactivación de estados sexuales de los parásitos (gametocitos) en plasma tomado en el momento de un paroxismo. Esos estudios han demostrado la participación de las citoquinas humanas TNF- α , GM-CSF e IL-2 junto con productos del parásito. Previos estudios, además, han demostrado el prominente aumento y caída de los niveles de TNF α , los cuales corresponden muy de cerca con el aumento y caída de la fiebre durante los paroxismos y la aparición transitoria de números elevados de células T gamma / delta en circulación periférica, en el momento de esos eventos (54)

Los factores plasmáticos activos, los cuales median agregación celular incluyen, principalmente, citoquinas derivadas de monocitos TNF α , GM-CSF e IL-6 y una citoquina derivada de células T, IL-10. Sin embargo, la actividad de esas citoquinas para mediar la agregación leucocitaria depende de la presencia simultánea de material derivado del parásito en el momento del paroxismo por *P. vivax*. La evidencia de la existencia de pirógenos asociados a paroxismo malárico o “toxinas maláricas”, como se conocían, fue proporcionada al demostrar que plasma de una persona en un paroxismo de malaria por *P. vivax* puede inducir rápidamente síntomas equivalentes cuando el plasma es inyectado en la circulación de un voluntario sano (54). Esto demuestra que los mediadores de un paroxismo malárico, el cual incluye productos del parásito o “toxinas” del mismo, están involucrados en interacciones con y entre células blancas sanguíneas circulantes.

Además, de las citoquinas, las células blancas sanguíneas liberan radicales libres y otros intermediarios moleculares activos. Esos mediadores con efectos inflamatorios y patogénicos, posee, además, efectos antiparasitarios (55)

Mecanismos celulares dependientes de anticuerpos (fagocitosis clásica y ADCI)

La adquisición de inmunidad a parásitos de malaria de estadios eritrocíticos de *plasmodium*, después de varios años de continua exposición a intensa transmisión, depende de mecanismos mediados por células y anticuerpos (56). El cambio gradual hacia inmunoglobulinas (Igs) de subclases IgG1 e IgG3, las cuales unen eficientemente todas las clases e isoformas de receptores Fc gamma (FcγR) presentes en la superficie de células efectoras, tales como monocitos, macrófagos y neutrófilos, se cree juega un papel clave en esos procesos (56).

La unión de anticuerpos citofílicos a células efectoras dispara respuestas efectoras, tales como opsonización y fagocitosis de parásitos extracelulares o células rojas parasitadas (pRBC), y mecanismos igual a citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC), conocidos como inhibición celular dependiente de anticuerpos (ADCI) de parásitos intracelulares, que causan la muerte de los parásitos (Figura 4). Dado que ADCI y el efecto de opsonización por anticuerpos citofílicos son competitivamente inhibidos, *in vitro*, por anticuerpos IgG2 e IgG4 no-citofílicos, con las mismas especificidades, sugiere que el balance de subclase puede ser un factor decisivo en la inmunidad naturalmente adquirida a malaria: sujetos protegidos o no protegidos pueden ser diferenciados por los niveles relativos de anticuerpos citofílicos que reconocen antígenos del parásito. Sujetos no inmune o parcialmente inmune, por ejemplo, tienden a producir predominantemente anticuerpos IgG de la subclase IgG2 durante las infecciones por malaria aguda y esta subclase ha sido asociada con una pobre inmunidad clínica (56).

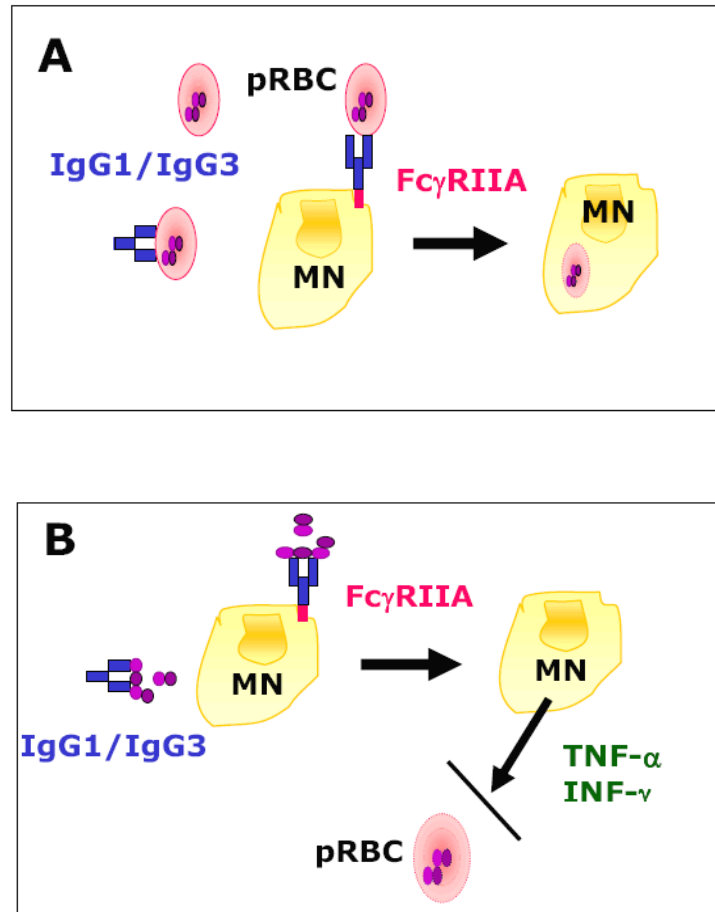


Figura 4: Mecanismos celulares dependientes de anticuerpos. (A) Fagocitosis clásica de células rojas parasitadas (pRBC). (B) Inhibición celular dependiente de anticuerpos. Mecanismo similar a ADCC, el cual inhibe el desarrollo de estados sanguíneos asexuales dentro de los eritrocitos a través de la liberación de factores (tales como, el factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interferón gamma (IFN- γ) por monocitos (MN). (Martins Braga et al, 2005.) (56)

Receptores de la fracción cristalizable (FCR)

Los leucocitos sanguíneos y los macrófagos de los tejidos se encargan de proteger al organismo de agentes extraños, a través del reconocimiento y eliminación de complejos antígeno-anticuerpo. La eliminación de tales complejos es mediada a través de la fijación de la fracción cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas a sus receptores (57). Existen diferentes tipos de receptores que tienen la capacidad de interactuar con la fracción Fc de las inmunoglobulinas; entre ellos se encuentran los transportadores de inmunoglobulinas como el receptor para IgA e IgM (57), así como receptores que unen IgE (58). Sin embargo, el grupo más grande es el de los receptores específicos para la fracción Fc de las

inmunoglobulinas G, también llamados receptores Fc gamma (FcγR), los cuales permiten el reconocimiento y destrucción de células o partículas cubiertas con IgG (59). Los FcγRs son glicoproteínas de superficie celular, que comprenden una familia conformada por múltiples miembros con cierta homología estructural. Dichos receptores son expresados en una amplia diversidad de células. Las funciones de estos receptores no se limitan sólo a la inmuno-fagocitosis, como se ha propuesto tradicionalmente (60), sino que pueden tener diferentes funciones dependiendo del tipo celular en el que se expresen. Diversos estudios de los genes y proteínas codificadas por esta familia de receptores, han demostrado que los diferentes tipos de FcγR poseen altamente conservados los dominios extracelulares tipo inmunoglobulina, pero difieren ampliamente en sus dominios transmembranales e intracelulares. La divergencia de estas regiones sugiere que aunque muchas de ellas son responsables de la transducción de señales, tal vez no todas están involucradas en esta actividad (61).

Por análisis molecular se ha identificado, en humano y en ratón, la presencia de diferentes genes que codifican para los receptores FcγR. Los productos de esos genes, se han dividido en tres grupos principales: FcγRI, FcγRII y FcγRIII (62). La distribución selectiva de los FcγR y su diversidad les permite mediar una amplia variedad de respuestas. La capacidad de estos receptores para unir diferentes ligandos representa una característica interesante, ya que la respuesta de una célula en particular al entrecruzamiento de sus receptores FcγR por complejos inmunitarios está determinada, no por la especificidad del ligando sino por los dominios transmembranales y citoplásmicos de los FcγR que se expresan en dicha célula. De esta manera los dominios de unión del ligando son conservados en todos los FcγR y éstos se encuentran acoplados a diferentes dominios intracelulares transductores de señales, que pueden responder de diferentes formas a un mismo estímulo (62).

Tradicionalmente, estos receptores se han vinculado con la capacidad inmuno-fagocítica de células efectoras como macrófagos y neutrófilos (60,63). Sin embargo, también se ha observado su participación en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (59), la producción del anión superóxido (64), el transporte de inmunoglobulina materna al feto a través de la barrera placentaria (65), la liberación de gránulos específicos en neutrófilos (59) y el control de la producción de citocinas y de inmunoglobulinas (66,67). Recientemente se describió el papel de los receptores Fc-gamma en la inducción de la apoptosis en algunos tipos celulares, tales como, linfocitos B, donde es inducida por el receptor tipo II al unirse con su ligando (68,69). Otro ejemplo lo

constituyen las células citotóxicas naturales (NK: *Natural Killer*), donde se presenta un efecto similar por la unión del Fc γ RIII a complejos inmunitarios o a anticuerpos monoclonales. Los leucocitos de sangre periférica expresan una serie de receptores de superficie que les permiten interactuar con complejos inmunitarios formados por virus-anticuerpos o bacterias-anticuerpos. La fagocitosis de microorganismos opsonizados por anticuerpos, mediada por leucocitos, está regulada por receptores para la región constante (Fc) de la inmunoglobulina G (IgG). En el humano existen 3 clases de receptores para el Fc de la IgG (Fc γ R): CD64 (Fc γ RI), CD32 (Fc γ RII), CD16 (Fc γ RIII) cada uno de ellos con propiedades funcionales y estructurales distintas (70). (Figura 5) Estos receptores una vez que interactúan con los complejos inmunitarios, son capaces de disparar funciones efectoras, tales como fagocitosis en monocitos/macrófagos, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo en células NK, activación de neutrófilos e inhibición de la activación de células B mediada por complejos inmunitarios (71) .

Se ha descrito una visión general de los mecanismos bioquímicos por los cuales las isoformas activadoras de los Fc γ Rs median la activación celular (72), pero no se ha estudiado con detalle la influencia de diferentes factores sobre la respuesta celular efectora, como es el estado de diferenciación de las células. Las células del sistema fagocítico mononuclear llevan a cabo un proceso de maduración complejo, que depende de diversos estímulos externos, dando lugar a diferentes fenotipos de macrófagos (73).

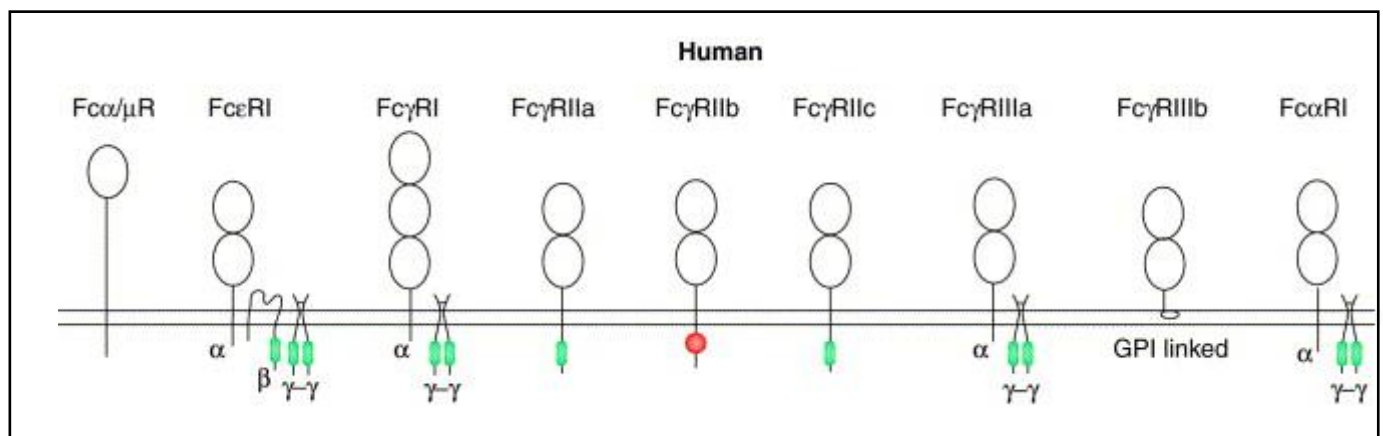


Figura 5: Estructura de los receptores Fc γ . (Pleass RJ, Wood JM., 2001) (74)

Polimorfismos de los genes *FCGR* [*FCGRIIA* (CD32); *FCGRIIIB* (CD16)]

Los receptores para el fragmento Fc de IgG (FcγRs) representan un eslabón crucial entre la respuesta inmunitaria celular y humoral. Estos receptores tienen como función principal activar células accesorias contra patógenos, por tal motivo son esenciales en la defensa contra infecciones (75). Los receptores FcγRs humanos son codificados por una familia de genes localizados en el brazo largo del cromosoma 1 (q21-24) (76) (figura 6). Cada familia de FcγR posee múltiples genes y distintas variantes de empalme (77).

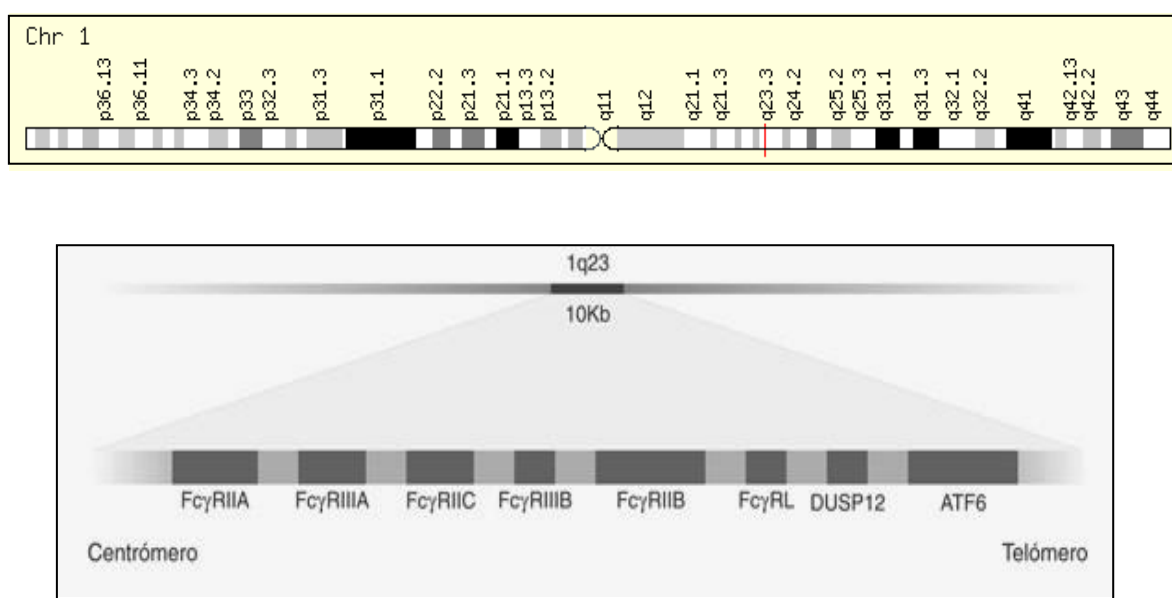


Figura 6: Organización genómica de los genes que codifican los receptores Fcγ. Dicha región está ubicada en el brazo largo del cromosoma 1. (Gómez LM *et al.*, 2006) (78).

Receptor FcγRIIA (CD32)

El receptor CD32 expresado en la superficie de los linfocitos y monocitos/macrófagos, es un receptor de baja afinidad para IgG capaz de unir las porciones Fc de los subtipos de inmunoglobulina IgG (79, 80) y es capaz de unir la proteína C reactiva, con alta afinidad. Sin embargo, tanto el reconocimiento de IgG y de la proteína C reactiva por CD32 se ven influenciadas por el polimorfismo en el gen. El gen *FCGRIIA* despliega un polimorfismo de un solo nucleótido funcionalmente relevante G→A en la región codificante del dominio de unión del ligando, el cual causa la sustitución de una arginina (R) por una histidina (H) en la posición 131 de su dominio extracelular. Ambos alotipos unen avidamente complejos IgG3 e IgG1 humanos, pero el alotipo CD32-H¹³¹ despliega una mayor afinidad por IgG2

e IgG3 humana que el alotipo CD32-R¹³¹, sin embargo, ninguno de ellos une IgG4 eficientemente. Dado que CD32-H¹³¹ es el único FcγR que interactúa eficientemente con IgG2 humana, este alotipo es esencial para la limpieza de complejos inmunes que poseen IgG2 (81) y fagocitosis de microorganismos opsonizados con IgG2 (82). Como una consecuencia, el polimorfismo CD32-R/H¹³¹ está asociado con predisposición a enfermedades autoinmunes e infecciones causadas por bacterias encapsuladas (83, 84, 85).

Además, de las diferencias en la afinidad de la inmunoglobulina, la expresión de los alelos H¹³¹ y R131, difieren en su capacidad de unir la proteína C reactiva. El alelo R¹³¹ al parecer es un receptor de alta afinidad por la proteína C reactiva, con el sitio de unión situado cerca de la IgG (86), mientras que la presencia del genotipo CD32-R¹³¹ aumenta la susceptibilidad a enfermedades de meningococo y neumococo (87,88). La proteína C reactiva y la inmunoglobulina parecen desempeñar un papel en la inmunidad de la malaria (89). Se ha demostrado, *in vitro*, que la proteína C reactiva se une a especies de *Plasmodium* y podrían tener un papel de protección en las primeras etapas de la infección (89), mientras que las inmunoglobulinas están involucradas en el control de la parasitemia a través de la inmunidad mediada por anticuerpos (90).

Estudios de las respuestas protectoras de anticuerpos han demostrado que la protección contra la enfermedad se correlaciona con IgG antígeno-específicas, en particular subtipos de inmunoglobulina IgG3 (91), que reconocen antígenos específicos causantes de la malaria, incluyendo la proteína-1, proteínas en la superficie del merozoíto-1 [MSP-1] y -2 [MSP-2] (92, 93). Además, los títulos antígeno-específicos de IgG2 específicos para MSP-2 y proteína rica en glutamato se han correlacionado positivamente con la protección de infección por malaria (94, 95). No obstante, sigue habiendo cierta incertidumbre en cuanto a cuál de estas subclases de IgG podría ser más importante en la inmunidad contra la malaria, y probablemente la actividad funcional de estos subtipos de inmunoglobulina depende, al menos en parte, del genotipo del receptor *FCGR1A* (96).

Receptor FcγRIIIB (CD16)

El receptor FcγRIIIB (CD16) es un receptor de membrana de baja afinidad, expresado exclusivamente en neutrófilos y pertenece a la familia de genes de las inmunoglobulinas. El receptor CD16 no tiene una región transmembranal ni una cola citoplasmática, se encuentra pegado a la membrana por una molécula de Glicosil-fosfatidil-inositol (GPI). Al no poseer una región citoplasmática se ha propuesto que el receptor

CD16 utiliza a otras moléculas, como integrinas o el receptor CD32, para mandar señales al interior de la célula. Aunque también se ha propuesto que el receptor CD16 es capaz de mandar señales por si mismo. Entre las respuestas que se han visto tras el entrecruzamiento del receptor CD16 se encuentran la liberación de calcio intracelular y la activación de quinasas. (97). El gen *FCGR3B* que codifica el receptor CD16, existe en dos formas alélicas, conocidas como *FCGR3B1* (CD16-NA1) y *FCGR3B2* (CD16-NA2), que difieren en cinco nucleótidos (nucleótidos 141, 147, 227, 277 y 349), una de los cuales es una mutación silente. Las isoformas del antígeno de neutrófilo humano (HNA) del CD16 difieren en su peso molecular relativo, el cual es de 50 a 65 kDa para HNA-1 (NA1) y 65 a 80 kDa para HNA-2 (NA2). El polimorfismo CD16-NA1/NA2 ejerce una fuerte influencia en la capacidad fagocítica de los neutrófilos. (98). Los neutrófilos con el genotipo CD16-NA2/NA2, tienen una capacidad más baja para fagocitar, que neutrófilos con el genotipo CD16-NA1/NA1. Además, CD32 y CD16 pueden estar simultáneamente relacionados en la iniciación de la función celular integrada, de manera tal, se ha demostrado que polimorfismos del gen *CD16* influyen en la función de CD32 de una forma alelo-específica (98). Una isoforma adicional del CD16 es el antígeno HNA-1c (SH) que ha sido asociado con el alelo *FCGR3B3* (CD16-SH). Los alelos NA2 y SH difieren por una mutación en un solo nucleótido (nucleótido 266, C→A) que produce un cambio de aminoácido en la posición 60 (alanina→ ácido aspártico) (99).

Susceptibilidad y/o resistencia a malaria

La resistencia del hospedero a la malaria es compleja, involucrando no solamente genes, tales como hemoglobinas anormales, deficiencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y DARC (antígeno Duffy), los cuales controlan la resistencia innata, sino además, otros genes, como los del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), *CD40* ligando, *CD32*, entre otros, los cuales regulan la respuesta inmune adaptativa. La primera puede afectar la sobrevivida en los primeros años de la infancia, mientras las respuestas inmunitarias adaptativas predominan en niños mayores y adultos que viven en donde la malaria es hiperendémica (100).

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)

Tanto el número absoluto de nacimientos como la proporción de ellos con defectos congénitos, son mucho mayores en los países de medianos y bajos ingresos a causa de las marcadas diferencias en salud materna y otros factores significativos de riesgo, como la

pobreza, el alto porcentaje de madres mayores, la mayor frecuencia de uniones consanguíneas y las alteraciones genéticas que confieren protección contra la malaria para los portadores, como la anemia de células falciformes, la talasemia y la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) (101)

La glucosa 6-fosfato deshidrogenada (G6PD) es una enzima hallada en todos los organismos vivos, donde cataliza el primer paso en la vía de la pentosa fosfato (102). Es una enzima de distribución ubicua, fundamental para la homeostasis corporal e intracitoplasmática, y su gen está localizado en la región distal del brazo largo del cromosoma X (Xq28) (103). El gen que la codifica tiene un tamaño de 18 Kb (104) y 13 exones (105). La proteína presenta un peso molecular de 59 kDa y la enzima activa está constituida por 515 residuos de aminoácidos (106).

Varios factores contribuyen a las disparidades en la distribución global de los defectos del nacimiento y uno de ellos es la malaria (107), cuya distribución geográfica es similar a la de la deficiencia de G6PD (103), encontrándose con mayor frecuencia en las regiones tropicales y subtropicales (105). La d-G6PD es una alteración metabólica (eritroenzimopatía) heredada y ligada al sexo, causada por un defecto en el gen que codifica la enzima G6PD (108), siendo la enzimopatía más común en el ser humano y el quinto defecto congénito más común a nivel mundial. Se calcula que hay, aproximadamente, 400 millones de individuos afectados en el mundo. Además, se uno de los trastornos con mayor heterogeneidad genética (109), ya que se han descrito más de 400 mutaciones, en su mayoría esporádicas (103). De todas estas variantes, 87 alcanzan frecuencias polimórficas (110) y más de 70 han sido caracterizadas molecularmente (109).

La d-G6PD tiene una distribución global, pero asimétrica debido a la ventaja selectiva que ofrece en las zonas con prevalencias altas de paludismo (101). Muchas mutaciones que reducen la actividad de la G6PD se han asociado con protección contra la infección de la malaria. Estas mutaciones pueden ser beneficiosas al reducir la tasa de crecimiento del parásito en los eritrocitos o al causar una fagocitosis más eficiente de los glóbulos rojos infectados en una primera etapa de la maduración de los parásitos (111).

Antígeno Duffy (DARC)

Los antígenos del grupo sanguíneo Duffy, son glicoproteínas expresadas en las membranas de los eritrocitos, con un peso molecular aparente entre 35 y 46 kDa (112). El gen *Fy*, localizado en el cromosoma 1, codifica dos alelos (FYA y FYB) que se expresan en forma codominante (113, 114). El polimorfismo del grupo sanguíneo Duffy es

importantes en las áreas donde el *Plasmodium vivax* predomina, ya que esta molécula actúa como un receptor de este protozooario (115). El polimorfismo Fy^a/Fy^b depende de una mutación del nucleótido 131 del gen *FY*, resultado en un cambio de aminoácido en la posición 44 (glicina⁴⁴ por Aspartato⁴⁴) en el dominio amino terminal (112). La combinación de estos polimorfismos conduce a los fenotipos Duffy $Fy(a+b+)$, $Fy(a+ b-)$, $Fy(a-b+)$, $Fy(a-b-)$ (116). Los glóbulos rojos de personas que presenten fenotipos Duffy $Fy(a+b+)$, $Fy(a+b-)$ y $Fy(a-b+)$ son igualmente susceptibles a la infección por *P. vivax*, mientras que aquellos con el fenotipo $Fy(ab-)$ son totalmente refractarios a este parásito (117). La ausencia de Fy de los hematíes de los individuos de muchos grupos étnicos africanos y sus descendientes no causa ningún efecto nocivo evidente, y confiere resistencia natural contra la infección por *P. vivax* (116).

Receptores Fc

Diferentes estudios han establecido asociaciones de diferentes alelos de los genes *FCGRs* y malaria grave por *P. falciparum*. En un estudio caso-control, en niños de una población de Kenia, observaron que en zonas de alta densidad los niños que poseían el genotipo $CD32-R/R^{131}$ eran significativamente menos propensos a la infección por *P. falciparum* en comparación con los lactantes con el genotipo $CD32-H/R^{131}$ (OR= 0,278; 95% (IC) = 0,123-0,627; p = 0,021) (118).

Adicionalmente, otro estudio examinó una posible asociación de los polimorfismos $CD32-H/R^{131}$ y $CD16-NA1/NA2$ con la gravedad de la malaria en Tailandia. Para ello, se estudió individuos sanos y pacientes con malaria cerebral, con malaria no cerebral grave y leve. Los resultados mostraron que el alelo $CD16-NA2$ y el genotipo $CD32-H/H^{131}$ estaba asociado con susceptibilidad a padecer malaria cerebral (OR =1,85; 95%(IC)= 1,14-3,01; p= 0,012) (98). A pesar que estos polimorfismos no están involucrados individualmente con la severidad de la enfermedad, los resultados sugieren que los polimorfismos $CD32-R^{131}$ y $CD16-NA1/NA2$ tienen un efecto sinérgico de defensa contra la infección por malaria (98).

En otro estudio, se investigó el papel del polimorfismo $CD32-H/R^{131}$ con enfermedades leves y graves de malaria en Gambia (África). El genotipo $CD32-H/H^{131}$ se asoció significativamente con la susceptibilidad al desarrollo de malaria severa (OR=1,40; 95%(IC)=1,02–1,91; p =0,03). Este hallazgo constituye la primera evidencia de una asociación entre el polimorfismo de *CD32* y malaria grave; constituyendo un ejemplo de un balance selectivo de las presiones de diferentes enfermedades infecciosas que operan en el mismo locus genético (96).

La inmunidad protectora contra el *Plasmodium falciparum* es parcialmente mediado a través de la unión de anticuerpos IgG malaria-específicos a los receptores FcγR. Además, la variabilidad polimórfica CD32-H/R¹³¹ se ha asociado con la unión diferencial de subclases de IgG y el desenlace de la enfermedad por malaria. El polimorfismo CD32-H/R¹³¹ fue estudiado en niños de Kenya que acudieron al hospital por malaria aguda. La variabilidad CD32-H/R¹³¹ no se asoció con anemia grave por malaria (SMA: siglas en inglés) [hemoglobina [Hb] < 6.0 g/dL] anemia por malaria (MA: siglas en inglés) [Hb < 8.0 g/dL]. Por otra parte, al comparar con el genotipo heterocigoto, el genotipo homocigoto R/R¹³¹ protege contra la alta densidad de parasitemia (HDP: siglas en inglés) (parásitos 10000/μL; OR =0,58, 95%(IC)= 0,37-0,92, p= 0,02), mientras que el genotipo homocigoto H/H¹³¹ confiere una leve protección (OR =0,71; 95%(IC)= 0,45-1,13, p= 0,14) (118). Sin embargo, el papel de la variabilidad de CD32-H/R¹³¹ en condicionar la susceptibilidad a anemia severa por malaria, principal manifestación de malaria severa en zonas holoendémicas de transmisión para *P. falciparum*, no fue establecida por este trabajo (119).

Finalmente, en un estudio realizado en pacientes procedentes de Ghana, África Occidental (120) se observó que el genotipo R/R¹³¹ estaba asociado positivamente con malaria severa (OR: 1.20, IC 95%: 1,05-1,38, p = 0,007, *pc* = 0,021) y con anemia severa (OR: 1.33, IC 95%: 1,13-1,57, *p*= 0,001, *pc* = 0,009), pero no con malaria cerebral (OR: 1.04, IC 95%: 0,82-1,33, *p*= 0,733) u otras complicaciones de malaria (OR: 1.03, IC 95%: 0,78-1,37, *p* = 0,827) (Tabla II). No obstante, cabe destacar que se han establecido asociaciones del polimorfismo de genes que codifican para otros receptores Fc (FcγRIIb) y el desarrollo de malaria, tal como el estudio de Willcocks *et al.*, (121), donde mostraron que un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) del gen *FCGR2B*, el cual guía a una sustitución isoleucina por treonina en la posición 232 del dominio trans-membrana del receptor FcγRIIb, estaba asociado con malaria severa (Tabla II).

Tabla II.

Características y principales conclusiones de los estudios de asociación entre el polimorfismo del gen *CD32* y la morbilidad de malaria por *Plasmodium falciparum*.

País	Comparación de grupos	Principales conclusiones	Referencias
Kenia	Niños de 1 año Alto riesgo (n=97) ^a Bajo riesgo (n=85) ^b	Exceso significativo homo-cigotos (R/R ¹³¹) en el grupo de bajo riesgo, cuando compararon con hetero-cigotos (H/R ¹³¹). Proporciones similares de homocigotos (H/H ¹³¹) en ambos grupos.	Shi et al. 2001 (118)
Tailandia	Pacientes mayores de 13 años, con media de 25 años Paludismo cerebral (n=107) Paludismo no cerebral malaria grave (n=157) malaria leve (n= 202)	Exceso significativo homo-cigotos (H/H ¹³¹) tienen el alotipo CD16-NA2 entre los pacientes con malaria cerebral, cuando compararon con los controles de malaria leve	Omi et al.,2002 (98)
Gambia	Niños con edades entre 0-10 años Malaria grave (n=524) Malaria leve (n=333) No infectados (controles) (n=558)	Exceso significativo homocigotos (H/H ¹³¹) entre los pacientes con malaria grave, cuando compararon con los no infectados (grupo control).	Cooke et al., 2003 (96)
Kenia	Niños menores de 4 años de edad con malaria grave .	La variación de <i>CD32</i> -H/R ¹³¹ no se asoció significativamente con (SMA). El genotipo heterocigoto (H/R ¹³¹) no protege contra anemia por malaria al compararlo con los genotipos homocigotos. El genotipo homocigoto R/R ¹³¹ protege contra (HDP) cuando se compara con el genotipo heterocigoto H/R ¹³¹	Ouma et al., 2006 (119)
Sudán	Sujetos Fulani viven en un área endémica de malaria por <i>P. falciparum</i> Sujetos no-Fulani que viven en la misma área.	El genotipo H/H131 tiene mayor frecuencia en el grupo étnico Fulani.	Nasr et al., 2009 (152)
Ghana (Africa Occidental)	Niños con malaria grave (n=2.504) y controles (n=2.027) controles sanos. 1.591 casos con anemia severa, 562 casos de malaria cerebral, y 497 casos con complicaciones de malaria	El genotipo <i>CD32</i> -R/R ¹³¹ se asoció positivamente con malaria severa y anemia severa, pero no con malaria cerebral. No se encontró asociación con los niveles de parasitemia.	Schuldt et al., 2010 (120)

Fuente: Martins, y col., 2005; Collins, y col., 2006. ^a Entre los lactantes de alto riesgo habían 30% con frotis de sangre positivo para *Plasmodium falciparum* (parásito cuenta> 5000 parásitos por microlitro) durante su primer año de vida. ^b Los lactantes de bajo riesgo habían 8% con frotis de sangre positivo para *Plasmodium falciparum* (parásito cuenta> 5000 parásitos por microlitro) durante su primer año de vida. H/H 131: Histidina-Histidina, R/R 131: Arginina-Arginina, H/R 131: Histidina-Arginina, SMA: Anemia grave por malaria, MA: Anemia por malaria, HDP: Alta densidad de parasitemia.

Variables

Gota gruesa y Extendido.

Para determinar la presencia de parásitos *Plasmodium*, a los individuos participantes (pacientes y controles) se les realizó la gota gruesa y el extendido en una misma lámina (36, 122, 123)

Detección de antimaláricos en orina

La detección de antimaláricos se realizó por el método de cromatografía en capa fina descrito por Betschart *et al.*, 1986. Este método permite detectar cloroquina (CQ) y su principal metabolito, la desetilcloroquina (DCQ), así como quinina (QUIN) y amodiaquina (AMO) en orina.

Determinación de IgG específicas a *Plasmodium vivax*

Se utilizó la prueba de inmuno-fluorescencia indirecta para detectar anticuerpos específicos anti-*Plasmodium vivax*, siguiendo el protocolo descrito previamente (124, 125).

Determinación de los niveles de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) en sangre

La determinación de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se realizó por fluorescencia.

Genotipaje del grupo sanguíneo Duffy

El genotipaje del grupo sanguíneo Duffy se realizó a través del protocolo reportado por Olsson *et al.* Para ello se utilizaron los iniciadores GATAFY2 (que flanquean la secuencia promotora GATA-1 mutada) y FYAREV (112)

Determinación de la presencia del parásito *Plasmodium sp.*

La secuencia del ADN mitocondrial del parásito *Plasmodium sp* se amplificó usando un simple, pero sensible método de PCR como herramienta, para detectar *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* (126). Los iniciadores específicos utilizados hibridan con los genes citocromo c oxidasa de *P. falciparum* (cox III) y *P. vivax* (cox I).

Polimorfismos de los genes FCGR [FCGRIIA (CD32) y FCGRIIB (CD16)]

Para el análisis de polimorfismo genético se utilizó las técnicas PCR-SSP (iniciadores de secuencias específicas), que permite identificar el polimorfismo directamente durante el proceso de PCR utilizando iniciadores específicos.

Genotipos

PCR- SSP del gen *FCGRIIA* (CD32)

Se analizó un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) del gen *FCGR1IA* (*CD32*), conocido como H/R131, en el cual un solo cambio de nucleótido resulta en una arginina (R, codón CGT) o una histidina (H, codón CAT) en el residuo aminoacídico 131 de la proteína madura (97).

PCR- SSP del gen *FCGR1IIB* (*CD16*).

Se analizó la presencia de las formas alélicas conocidas como *FCGR1IIB1* (*CD16-NA1*) y *FCGR1IIB2* (*CD16-NA2*), que difieren en cinco nucleótidos (nucleótidos 141, 147, 227, 277 y 349) (97).

Procedencia.

Se estudiaron 147 individuos, agrupados en sanos (n=54) y pacientes palúdicos (n=93), procedentes de diferentes municipios (Arismendi, Benítez, Bermúdez, Cajigal, Ribero) del estado Sucre.

Edad.

Años cumplidos.

Género

Masculino y femenino.

Dado que en la infección por *Plasmodium* los receptores $FC\gamma$ (*CD32* y *CD16*) juegan un papel importante en la respuesta inmunitaria contra este patógeno, y que la expresión o afinidad de esos receptores de IgG (*CD32* y *CD16*) está determinado genéticamente, planteamos la siguiente hipótesis y objetivos:

Hipótesis

Si la expresión o afinidad de los receptores de IgG ($FC\gamma R$) está determinado genéticamente entonces los diferentes alelos y/o genotipos de estos genes pudiesen alterar la función de los receptores $FC\gamma R$ ($FC\gamma R1IA$, $FC\gamma R1IIB$) y jugar un papel clave en la susceptibilidad a la infección por *Plasmodium vivax*.

Objetivo general

Evaluar el papel del polimorfismo de los genes *FCGR* (*CD32*, *CD16*) en la infección por *Plasmodium vivax*.

Objetivos específicos

- a- Establecer la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos *CD32* y *CD16* en individuos venezolanos sanos e infectados con *Plasmodium vivax*
- b- Establecer posibles asociaciones entre el polimorfismo en los genes *FCGR* (*CD32*, *CD16*) y susceptibilidad y/o resistencia a la infección por *P. vivax*

MÉTODOS

Tipo y diseño de la investigación

Se realizó un estudio observacional de corte transversal.

Población y muestra

Se estudiaron 93 individuos venezolanos no relacionados que sufrieron infecciones por *P. vivax*, con edades comprendidas entre 18 y 65 años, con una edad promedio de 39,37 años, que acudieron a la consulta de malaria en los diferentes municipios (Arismendi, Benítez, Bermúdez, Cajigal, Ribero) del estado Sucre. Para establecer las asociaciones, los pacientes fueron agrupados de acuerdo al número de episodios maláricos (Grupo 1: con un solo episodio malárico, Grupo 2: con 2 a 6 episodios maláricos y Grupo 3: con siete o más episodios maláricos)

Las muestras fueron recolectadas en el segundo y tercer trimestre del año 2009 y segundo trimestre del año 2010.

Los criterios de inclusión y exclusión en la selección de los pacientes fueron los siguientes:

Criterios de inclusión

- 1- Individuos no relacionados con diagnóstico clínico y parasitológico de malaria por *P. vivax*, para el momento de la toma de muestra.
- 2- Individuos que hayan sufrido episodios maláricos previos.
- 3- Individuos con un rango de edad comprendido entre 18 y 65 años, sin consideración de sexo.

Criterios de exclusión

- 1.- Se excluyeron aquellas personas con el sistema inmunológico comprometido, tales como individuos con trasplantes o en quimioterapia, así como personas con otras patologías (autoinmunes e infecciosas). Así como individuos con problemas de alcoholismo, trastornos mentales, trastornos hematológicos (drepanocitosis) y mujeres embarazadas.

El diagnóstico parasitológico se basó principalmente en gota gruesa y extendido tenidos con Giemsa, la muestra de sangre se tomó del lóbulo de la oreja. A los individuos se les realizó el examen físico para evaluar: hepatomegalia por hepatometría, y esplenomegalia por índice de Boyd, el resultado de la evaluación se registró en la historia clínica correspondiente.

Como parte del grupo control se estudiaron, 54 individuos venezolanos aparentemente sanos, con similar background étnico, a los cuales se les determinó los siguientes parámetros: 1.- Presencia de parásitos en sangre 2.- Presencia de antimalaricos en orina, 3.-Presencia de IgG específicos para *P. vivax* en plasma 4.- Niveles de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en sangre, 5.- Presencia del antígeno sanguíneo Duffy y 6.- Presencia de ADN mitocondrial de *P. vivax* y/o *P.falciparum*.

Los criterios de inclusión y exclusión para la selección de este grupo fueron los siguientes:

Criterios de inclusión

- 1-Individuos no relacionados, sanos, procedentes de las mismas zonas de los pacientes
- 2- Individuos con más de 10 años de residencia en las zonas estudiadas (endémicas para *P. vivax*), para el momento de la toma de muestra.
- 3- Individuos con pruebas de orina negativa para antimaláricos.
- 4- Individuos con un rango de edad comprendido entre 18 y 65 años, sin consideración de sexo.
- 5- Individuos IgG y PCR negativo para *Plasmodium*

Criterios de exclusión

- 1.- Se excluyeron aquellas personas con el sistema inmunológico comprometido, tales como individuos con trasplantes o en quimioterapia, así como personas con otras patologías (autoinmunes e infecciosas). Así como individuos con problemas de alcoholismo, trastornos mentales, trastornos hematológicos (drepanocitosis) y mujeres embarazadas.
- 2- Individuos con pruebas de orina positiva para antimaláricos.
- 3- Individuos Duffy negativos y con hemoglobinopatías.
4. Individuos con deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Procedimientos y técnicas

Previo a la recolección de las muestras, se les solicitó a los individuos participantes la firma de un consentimiento informado. Cada individuo fue informado acerca del estudio y del destino que se le daría a la muestra. Este consentimiento fue aprobado previamente por el Comité de Bioética del IVIC y el Comité Ético Científico del Instituto de Medicina

Tropical. A los pacientes se les realizó, además, una breve historia clínica, donde se registraron los criterios epidemiológicos y clínicos para el diagnóstico de la infección por *P. vivax*.

Examen parasitológico

Tanto a los pacientes como a los individuos sanos, se les realizó gota gruesa y extendido en una misma lámina (36, 121, 122), para determinar la presencia de parásitos *Plasmodium*, teñidos con Giemsa.

Detección de antimaláricos en orina de individuos sanos

Para la detección de anti-maláricos en orina se realizó el método de cromatografía en capa fina descrito por Betschart (127). Este método permite determinar cloroquina (CQ) y su principal metabolito, la desetilcloroquina (DCQ), así como quinina (QUIN) y amodiaquina (AMO) en orina. El procedimiento consistió en colocar directamente 25 µl de las muestras de orina, así como de los controles para CQ, QUIN, AMO y de orina negativa en cada placa de aluminio recubierta con sílica gel (Merk-art 5553). Las placas fueron secadas y colocadas en una corrida, en la cámara de vidrio para cromatografía, la cual tuvo como mezcla solvente: tolueno-dietilamina-metanol (8:1:1), por aproximadamente 20 minutos hasta alcanzar el frente de la corrida. Una vez secas las láminas, en un cuarto oscuro se evidenció la presencia de cloroquina y otros medicamentos antimaláricos con una lámpara de luz UV. En cada corrida se incluyó los controles tratados con las drogas (control positivo), los controles sin tratamiento (control negativo) y los individuos sanos.

Tabla III

Antimaláricos utilizados para realizar cromatografía en capa fina

Control Negativo	Antimaláricos	Control positivo	Muestras de orina
CN1 CN2	Cloroquina -(CQ50)- 50 µg/ml Cloroquina -(CQ5)- 5 µg/ml Cloroquina -(CQ1)- 1 µg/ml Quinina - (Q) - 100 µg/ml Amodiaquina - (AMO) -100 µg/ml	CP1 CP2 CP3 CP4	INDIVIDUOS SANOS

Recolección de las muestras de sangre periférica

Tanto a los pacientes como a los individuos sanos se les extrajo 10 ml de sangre periférica utilizando tubos recolectores con EDTA como anticoagulante. Inmediatamente después de la toma de las muestras, éstas se transportaron a temperatura de refrigeración (comprendida entre 4-8°C) en una cava con bolsas de termo pack (criogel) y fueron llevadas al Laboratorio de Fisiopatología, Sección Inmunogenética, en el Centro de Medicina Experimental “Miguel Layrisse” en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Posteriormente se procedió a la determinación de anticuerpos contra *plasmodium*, deficiencia de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y extracción del ADN genómico

Determinación de IgG específicas a *Plasmodium vivax* en plasma de individuos sanos

La determinación de IgG específicas a *Plasmodium vivax* en plasma de individuos sanos se realizó en colaboración con la Dra. Carmen Bracho, del Laboratorio Inmunoparasitología, del Centro de Microbiología y Biología Celular del IVIC. Para ello, se utilizó la prueba de inmuno-fluorescencia indirecta para detectar anticuerpos específicos anti-*Plasmodium vivax*, siguiendo protocolo descrito previamente (124, 125). Para ello se utilizaron láminas portaobjeto multi-especimen (Eric-Scientific, E.V.A). En cada pozo se colocaron 5 µL de la suspensión celular con glóbulos rojos parasitados (GRP) (trofozoitos o esquizontes) ajustada a 2×10^6 GRP/ml. Las células se dejaron secar a temperatura ambiente, en un lugar libre de polvo y posteriormente fueron fijadas con acetona (Merk, Alemania) fría a -20°C por 20 minutos. Tras escurrir el exceso de acetona las láminas

fueron protegidas con un envoltorio doble papel absorbente y otro aluminizado y almacenadas a -20°C, resguardadas de la humedad, hasta su uso. Cuando fueron utilizadas para el ensayo se retiraron de la nevera y se dejaron a temperatura ambiente por 5 minutos y luego fueron colocadas en cámara húmeda por 10-15 minutos. Posteriormente se colocaron 20 µL de cada dilución (1:40) en PBS/gelatina 2%/Timerosal 0.01% de las muestras de plasma bajo estudio. Las láminas se incubaron por 30 minutos a 37°C en cámara húmeda y se lavaron tres veces con PBS (3 minutos por lavado). La incubación con los anticuerpos, anti IgG o sus isotipos, procedió de una manera similar y luego de tres lavados se agregó una dilución de conjugado correspondiente, durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Luego de tres lavados con PBS y uno con agua destilada, se procedió la adición de 10 µL de la solución de montaje (Glicerol (Merk) al 70% en PBS). Después de colocar una laminilla cubreobjeto, las células se inspeccionaron bajo un microscopio Zeiss modelo Standard, equipado con iluminación fluorescente (lámpara de mercurio HBO 5W), un sistema de filtros para excitación en el rango 450-490nm y un filtro supresor L520.

La prueba cuantitativa se realizó con diluciones seriadas mayores de 1:40, factor 4, para determinar el título de anticuerpos específicos. Se tomó como título de anticuerpo, la máxima dilución del plasma que produjo una reacción positiva (124)

Determinación de los niveles de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) en sangre de individuos sanos

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), al considerar la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) los individuos se pueden clasificar en 3 grupos: deficientes de actividad <2 U/gHb, moderadamente deficientes entre 3.5 a 8.7 U/gHb y normales mayor de 8.8 U/gHb (128).

Para la determinación de los niveles de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) en sangre de individuos sanos contamos con la colaboración de la Dra. Aixa Muller de Soyano (Clínica Avila) y del Dr. Andrés Soyano (IVIC). La prueba consistió en un ensayo de detección fluorescente. Para ello, sangre tomada del dedo fue aplicada en papel de filtro Whatman y dejada secar. Luego se procedió a cortar un redondillo de 1 cm de diámetro del papel de filtro con la mancha de sangre seca y dicho redondillo de papel de filtro se colocó en un tubo de ensayo limpio 12x10 mm y se le agregó 0.5 mL de la mezcla de reactivos [Glucosa -6-P (0.01 M), NADP (7.5 mM), Saponina (1%), Buffer Tris-HCl (750 mM, pH

7,8), GSSG 8 (mM), agua], se mezcló y se observó el hemolizado de glóbulos rojos, posteriormente se incubó a 37°C por 10 minutos. Luego se tomó 100 µL del hemolizado de globulos rojos y se transfirió a otro papel de filtro a los cero min, 5 min y 10 min, dejándose secar a temperatura ambiente. Se colocaron como control muestras de sangre de individuos con niveles normales de G-6-PD y de pacientes deficientes hemicigoto para G-6-PD. Posteriormente, se procedió a la detección de la señal con una lámpara fluorescente. Los hemolisados de glóbulos rojos con niveles normales de G-6-PD mostraron una fluorescencia verdosa brillante, mientras que los hemolisados deficientes en G-6-PD no mostraron fluorescencia.

Extracción del ADN genómico

Se partió de una muestra de 10mL de sangre periférica, con EDTA como anticoagulante. Se centrifugó la muestra por 10 minutos a 2000 rpm para obtener los leucocitos (una capa blanca entre los eritrocitos y el plasma). Se transfirió esta capa con la ayuda de una pipeta Pasteur a otro tubo de centrifuga y se lavó con 10mL de amortiguador de lisis de células rojas (RCLB-red cell lysis buffer). Se invirtió varias veces y se dejó congelando por varios minutos a fin de acelerar el proceso de lisis de los eritrocitos restantes. Se procedió a centrifugar nuevamente a 2000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado con RCLB tantas veces fue necesario para eliminar los restos de hemoglobina, hasta obtener un precipitado de leucocitos el cual debe ser blanco con un halo rosado. Cuando el precipitado esta homogéneamente blanco puede ser almacenado a -70°C.

Posteriormente se resuspendió el precipitado en 3mL de amortiguador de lisis nuclear (NLB-nuclear lysis buffer) y se incubó en baño a 56°C hasta que el precipitado se disolvió completamente. Luego, se añadió 1mL de cloruro de sodio (NaCl 5,25 M), se agitó en vórtex, se añadió 2mL de cloroformo, se agitó hasta que se formó una solución lechosa y se centrifugó por 20 minutos a 2500 rpm. A continuación, se aspiró el ADN (fase acuosa o soluble) y se transfirió un tubo de polipropileno, si la fase de ADN no estaba clara en apariencia, se repitió el paso con cloroformo. A la fase acuosa osoluble obtenida se le agregó 2 volúmenes de etanol 95% (preferiblemente frío), se rotó suavemente el tubo hasta que todo el ADN precipitó. La malla de ADN se atrapó con la ayuda de una pipeta de transferencia de polipropileno y se colocó en un tubo eppendorf de 1,5mL estéril. Se resuspendió el ADN en etanol 70% y se centrifugó por 5 minutos a 13000 rpm, se removió

el exceso de etanol, volteando el tubo con mucho cuidado sobre una servilleta y se dejó secar el etanol restante. Finalmente, el ADN se resuspendió en agua bidestilada estéril, pero si es para almacenar es recomendable diluirlo con amortiguador (buffer), ya que el ADN almacenado en agua está sujeto a degradación por lisis ácida. Se recomienda el uso de buffer EE (Epps-EDTA) (129)

La concentración de ADN esperada se encontró en el rango de 0,2 a 1,0 mg/mL, se recomienda tomar nota siempre de la cantidad de solvente añadido, pues luego se necesitará para el ajuste.

Ajuste del ADN

La concentración de ADN se midió por lectura de la densidad óptica (DO), midiendo la absorbancia a 260nm y a 280nm de una dilución de ADN 1:50 (V/V), utilizando un espectrofotómetro (SmartSpec 3000, BIORAD)

Se calculó el índice= DO_{260nm} / DO_{280nm} (este debe ser mayor de 1.6, asegurando la pureza del ADN). Esta relación indica la pureza del ADN aislado.

La concentración del ADN ($\mu\text{g/ml}$) viene dada por la fórmula:

$[\text{ADN}] = 50 \text{ (factor constante)} \times 50 \text{ (factor de dilución)} \times DO_{260nm}$.

$1 DO_{260nm} = 50 \mu\text{g de ADN/mL}$ (130)

Se ajustó la concentración de $[\text{ADN}]$ a $200\mu\text{g/mL}$.

Evaluación de la integridad del ADN

La integridad del ADN ajustado se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7% en TBE 1X (0,5M Tris -HCl. 0,6M, 10mM EDTA- Na_2 , pH=8,2) utilizando bromuro de etidio como colorante, a una concentración de $0,5 \mu\text{g/mL}$, para su posterior visualización en un transiluminador con luz ultravioleta. En cada carril del gel se colocaron $5 \mu\text{L}$ de ADN mezclado con $2 \mu\text{L}$ del buffer de carga y utilizando como control $5 \mu\text{L}$ del fago Lambda sin digerir y con una concentración de $200 \mu\text{g/mL}$ (Promega). Las corridas electroforéticas se realizaron a 100 voltios durante media hora

Métodos para el análisis de los polimorfismos

La reacción en cadena de la polimerasa conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular descrita en 1985 por Kary Mullis, que consiste en el aumento o amplificación exponencial de la secuencia de un ADN molde utilizando iniciadores específicos. La técnica se basa en la separación por

calor de las dos cadenas del ADN que se quiere amplificar a partir de un punto marcado por dos segmentos pequeños de ADN conocidos como cebadores (oligómeros o iniciadores), que están constituidos por 10 a 30 nucleótidos e indican el inicio y el final del fragmento a duplicar. Mediante la acción de una enzima denominada ADN polimerasa, se van agregando en forma complementaria los nucleótidos necesarios para obtener una réplica exacta de la cadena original. Este procedimiento se repite varias veces y se obtienen múltiples copias del fragmento de ADN escogido. Sus únicos requerimientos es que existan nucleótidos en el medio (adenina, guanina, citosina y timina), cebadores, ADN original y la enzima ADN polimerasa. Debido que para el desarrollo de la técnica se emplean temperaturas mayores de 70°C, se requiere de una enzima que no se inactive a temperaturas elevadas, por lo que se emplea la ADN polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en aguas termales y cuya enzima puede trabajar a altas temperaturas (130)

El proceso se repite un número determinado de veces o ciclos, generalmente 30, y se consigue un aumento o amplificación exponencial del número de copias del fragmento de ADN que se escogió como molde. La ventaja de la técnica es que amplifica únicamente el fragmento de ADN que queremos, aunque esté en cantidades mínimas (alta sensibilidad) o en presencia de grandes cantidades de ADN semejantes (alta especificidad). La reacción es eficaz incluso si se parte de muestras de ADN muy poco purificadas, es decir, que se encuentran en presencia de otros componentes. La PCR se aplicó inicialmente como una técnica de laboratorio de investigación, pero su gran especificidad y sensibilidad ha permitido el desarrollo de técnicas específicas basadas en ella con aplicación en muchos campos de la investigación y el análisis. (131).

Para el análisis del polimorfismo genético se utilizó la técnica **PCR-SSP** (Reacción en cadena de la polimerasa utilizando iniciadores de secuencias específicas), la cual permite identificar el polimorfismo directamente durante el proceso de PCR, utilizando para ello iniciadores específicos (129).

Los termocicladores Perkin Elmer (GeneAmp 2400) y Applied Biosystems (Thermal Cycler 2720 y 9700) se utilizaron en el estudio para realizar las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR).

Genotipaje del grupo sanguíneo Duffy

El genotipaje del grupo sanguíneo Duffy se llevó a cabo a través del protocolo reportado por Olsson y colaboradores (112). La tipificación del alelo Fya fue elaborada con los iniciadores indicados en la Tabla IV.

TABLA IV
Iniciadores utilizados para determinar las variantes del alelo Fya

Variante polimórfica	Iniciadores	Secuencia(5'-3')	Temperatura	Tamaño (pb)
<i>FYAB2</i> <i>FYAREV1</i>	Sentido Antisentido	CTCATTAGTCCTTGGCTCTTAT AGCTGCTTCCAGGTTGCAC	69° C-64° C	711
<i>ABO-516</i> <i>ABO-926</i>	Sentido Antisentido	GCTGGAGGTGCGCGCCTAC ACGAATTCTACTTGTTTCAGGTGGCTCTCGTC	69° C-64° C	419

Se indica la temperatura de hibridación del iniciador al molde de ADN y el tamaño del producto amplificado correspondiente.

Se amplificó como control interno de la PCR el gen *ABO*.

Para la realización de la amplificación se preparó una mezcla de reacción de 20 µL que consistió en: 10,65 µL de agua destilada, 2µL de PCR Buffer (1X), 0,5µM de los iniciadores *FYAB2* y *FYAREV1*, 0,5 µM de los iniciadores de *ABO-516* y *ABO 926*, 1 µL de KCl (2,5mM), 0,4 µL de Tris HCl (0,4mM) 0,4µL de dNTPs (0,2mM), 1,3 µL de MgCl₂ (3,3mM), 0,25 µL de la enzima Taq polimerasa (1,25 U/ml) (Taq platinum, Invitrogen) y 2µL de ADN genómico (200 µg/ml). Se incluyó un control negativo (mezcla de reacción sin ADN) para descartar contaminación. Las siguientes condiciones fueron utilizadas para la amplificación: 96°C por 8 minutos, seguida por 10 ciclos con las siguientes características: desnaturalización a 94°C por 20 segundos, hibridación a 69°C por 1 minuto seguida por 25 ciclos con las siguientes características: desnaturalización a 94°C por 20 segundos hibridación 64°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto. Después de realizar el número de ciclos señalados, la etapa de extensión final se realizó a 72°C por 10 minutos.

El producto de PCR (711pb para Fya y 419pb para ABO) se verificó en geles de agarosa al 2% (Sigma) teñidos con bromuro de etidio (0,5µg/ml). La corrida se realizó a 100

V por 30 minutos, utilizando como referencia un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Axygen).

La tipificación del alelo Fyb fue elaborada con los iniciadores indicados en la Tabla V.

TABLA V
Iniciadores utilizados para determinar las variantes del alelo Fyb

Variante polimórfica	Iniciadores	Secuencia(5'-3')	Temperatura	Tamaño (pb)
<i>FYAB2</i> <i>FYAREV2</i>	Sentido Antisentido	CTCATTAGTCCTTGGCTCTTAT AGCTGCTTCCAGGTTGGCAT	69° C-64° C	711
<i>ABO-516</i> <i>ABO-926</i>	Sentido Antisentido	GCTGGAGGTGCGCGCCTAC ACGAATTCTACTTGTTCAGGTGGCTCTCGTC	69° C-64° C	419

Se indica la temperatura de hibridación del iniciador al molde de ADN y el tamaño del producto amplificado correspondiente.

Se amplificó como control interno de la PCR el gen *ABO*.

Para la realización de la amplificación se preparó una mezcla de reacción de 20 µL que consistió en: 10,65 µL de agua destilada, 2µL de PCR Buffer (1X), 0.5µM de los iniciadores *FYAB2* y *FYAREV2*, 0.5 µM de los iniciadores de *ABO-516* y *ABO 926*, 1 µL de KCl (2,5mM), 0.4 µL de Tris HCl (0,4mM) 0.4µL de dNTPs (0.2mM), 1,3 µL de MgCl₂ (3,3mM), 0.25 µL de la enzima Taq polimerasa (1,25 U/ml) (Taq platinum, Invitrogen) y 2µL de ADN genómico (200 µg/ml). Se incluyó un control negativo (mezcla de reacción sin ADN) para descartar contaminación. Las siguientes condiciones fueron utilizadas para la amplificación: 96°C por 8 minutos, seguida por 10 ciclos con las siguientes características: desnaturalización a 94°C por 20 segundos, hibridación a 69°C por 1 minuto seguida por 25 ciclos con las siguientes características: desnaturalización a 94°C por 20 segundos hibridación 64°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto. Después de realizar el número de ciclos señalados, la etapa de extensión final se realizó a 72°C por 10 minutos.

El producto de PCR (711pb para Fyb y 419pb para ABO) se verificó en geles de agarosa al 2% (Sigma) teñidos con bromuro de etidio (0,5µg/ml). La corrida se realizó a 100 V por 30 minutos, utilizando como referencia un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Axygen).

La tipificación del alelo nulo silvestre FY fue elaborada con los iniciadores GTAFY2 (que demarca la secuencia promotora GATA-1 mutada) y el iniciador antisentido FYAREV1 (Tabla VI)

Tabla VI
Iniciadores utilizados para determinar las variantes del alelo nulo silvestre FY.

Variante polimórfica	Iniciadores	Secuencia(5'-3')	Temperatura	Tamaño (pb)
GTAFY2 FYAREV1	Sentido Antisentido	CTCATTAGTCCTTGGCTCTTAC AGCTGCTTCCAGGTTGGCAT	69° C-64° C	711
ABO-516 ABO-926	Sentido Antisentido	GCTGGAGGTGCGCGCCTAC ACGAATTCTACTTGTTTCAGGTGGCTCTCGTC	69° C-64° C	419

Se indica la temperatura de hibridación del iniciador al molde de ADN y el tamaño del producto amplificado correspondiente.

Se amplificó como control interno de la PCR el gen ABO.

Para la realización de la amplificación se preparó una mezcla de reacción de 20 µL que consistió en: 10,65 µL de agua destilada, 2µL de PCR Buffer (1X), 0,5µM de los iniciadores GTAFY2 y FYAREV1, 0,5 µM de los iniciadores de ABO-516 y ABO 926, 1 µL de KCl (2,5mM), 0,4 µL de Tris HCl (0,4mM) 0,4µL de dNTPs (0,2mM), 1,3 µL de MgCl₂ (3,3mM), 0,25 µL de la enzima Taq polimerasa (1,25 U/ml) (Taq platinum, Invitrogen) y 2µL de ADN genómico (200 µg/ml). Se incluyó un control negativo (mezcla de reacción sin ADN) para descartar contaminación. Las siguientes condiciones fueron utilizadas para la amplificación: 96°C por 8 minutos, seguida por 10 ciclos con las siguientes características: desnaturalización a 94°C por 20 segundos, hibridación a 69°C por 1 minuto seguida por 25 ciclos con las siguientes características: desnaturalización a 94°C por 20 segundos hibridación 64°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto. Después de realizar el número de ciclos señalados, la etapa de extensión final se realizó a 72°C por 10 minutos.

Una reacción negativa fue definida como la presencia de la banda correspondiente al control interno (419 pb), mientras una reacción positiva se definió como la presencia de una banda de 711 pb con o sin la banda de control de amplificación.

El producto de PCR (711pb para FY y 419pb para ABO) se verificó en geles de agarosa al 2% (Sigma) teñidos con bromuro de etidio (0,5µg/ml). La corrida se realizó a 100 V por 30 minutos, utilizando como referencia un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Axygen).

La tipificación del alelo nulo silvestre FY fue elaborada con los iniciadores GTAFY2 (que demarca la secuencia promotora GATA-1 mutada) y el iniciador sentido FYAREV2 (Tabla VII)

Tabla VII
Iniciadores utilizados para determinar las variantes del alelo nulo FY

Variante polimórfica	Iniciadores	Secuencia(5'-3')	Temperatura	Tamaño (pb)
GTAFY2 FYAREV2	Sentido Antisentido	CTCATTAGTCCTTGGCTCTTAC AGCTGCTTCCAGGTTGGCAT	69° C-64° C	711
ABO-516 ABO-926	Sentido Antisentido	GCTGGAGGTGCGCGCCTAC ACGAATTCTACTTGTTCAGGTGGCTCTCGTC	69° C-64° C	419

Se indica la temperatura de hibridación del iniciador al molde de ADN y el tamaño del producto amplificado correspondiente.

Se amplificó como control interno de la PCR el gen ABO.

Para la realización de la amplificación se preparó una mezcla de reacción de 20 µL que consistió en: 10,65 µL de agua destilada, 2µL de PCR Buffer (1X), 0.5µM de los iniciadores GTAFY2 y FYAREV2, 0.5 µM de los iniciadores de ABO-516 y ABO 926, 1 µL de KCl (2,5mM), 0.4 µL de Tris HCl (0,4mM) 0.4µL de dNTPs (0.2mM), 1,3 µL de MgCl₂ (3,3mM), 0.25 µL de la enzima Taq polimerasa (1,25 U/ml) (Taq platinum, Invitrogen) y 2µL de ADN genómico (200 µg/ml). Se incluyó un control negativo (mezcla de reacción sin ADN) para descartar contaminación. Las siguientes condiciones fueron utilizadas para la amplificación: 96°C por 8 minutos, seguida por 10 ciclos con las siguientes características: desnaturalización a 94°C por 20 segundos, hibridación a 69°C por 1 minuto seguida por 25 ciclos con las siguientes características: desnaturalización a 94°C por 20 segundos hibridación 64°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto. Después de realizar el número de ciclos señalados, la etapa de extensión final se realizó a 72°C por 10 minutos.

El producto de PCR (711pb para FY y 419pb para ABO) se verificó en geles de agarosa al 2% (Sigma) teñidos con bromuro de etidio (0,5µg/ml). La corrida se realizó a 100 V por 30 minutos, utilizando como referencia un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Axygen).

Determinación de la presencia del parásito *Plasmodium sp.* en individuos sanos

La secuencia del ADN mitocondrial fue amplificado usando un simple, pero sensible método de PCR como herramienta, para detectar *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*. Los iniciadores específicos utilizados hibridan con los genes citocromo c oxidasa de *P. falciparum* (cox III) y *P. vivax* (cox I). La detección de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* se realizó utilizando los iniciadores y el protocolo reportado por Cunha y colaboradores (127) (tabla VIII)

Tabla VIII

Iniciadores utilizados para determinar ADN mitocondrial de *P.vivax* y *P. falciparum*

Variante polimórfica	Iniciadores	Secuencia(5'-3')	Temperatura	Tamaño (pb)
<i>Pv 1</i> <i>Pv 2</i>	Sentido Antisentido	AAGTGTGTATGGGCTCATCATATG CAAAATGGAAATGAGCGATTACAT	60° C	290
<i>Pf1</i> <i>Pf2</i>	Sentido Antisentido	CCTGCATTAAACATCATTATATGGTACATCT GATTAACATTCTTGATGAAGTAATGATAATACCTT	60° C	273

Se indica la temperatura de hibridación del iniciador y el tamaño del producto amplificado correspondiente.

Para la realización de la amplificación se preparó una mezcla de reacción de 20 µL que consistió en: 10,65 µL de agua destilada, 2µL de PCR Buffer (1X), 0,5µM de los iniciadores Pv1 y Pv2, 0,5 µM de los iniciadores de Pf1 y Pf2, 1 µL de KCl (2,5mM), 0,4 µL de Tris HCl (0,4mM) 0,4µL de dNTPs (0,2mM), 1,3 µL de MgCl₂ (3,3mM), 0,25 µL de la enzima Taq polimerasa (1,25 U/ml) (Taq platinum, Invitrogen) y 2µL de ADN genómico (200 µg/ml). Se incluyó un control negativo (mezcla de reacción sin ADN) para descartar contaminación y un control positivo (ADN de *P. vivax* o *P. falciparum*, ADN de individuos infectados). Las siguientes condiciones fueron utilizadas para la amplificación: 96°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos con las siguientes características: desnaturalización a 95°C por 1 minuto, hibridación a 62°C por 1 minuto y extensión 72°C por 1 minuto. Después de realizar

el número de ciclos señalados, la etapa de extensión final se realizó a 72°C por 7 minutos.

El producto de PCR (290pb para Pv y 273pb para Pf) se verificó en geles de agarosa al 1.5% (Sigma), teñidos con bromuro de etidio (0,5µg/ml). La corrida se realizó a 100 V por 30 minutos, utilizando como referencia un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Axygen).

PCR- SSP del gen *FCGR1IA* (CD32)

El gen *FCGR1IA* despliega un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) funcionalmente relevante G→A en la región codificante del dominio de unión del ligando, el cual causa la sustitución de una arginina (R, codón CGT) por una histidina (H, codón CAT) en la posición 131 de su dominio extracelular (81). Este SNP se definió por PCR-SSP siguiendo el protocolo y los iniciadores reportados previamente (99, 132). Para la amplificación de la variante H/R131 se utilizaron los iniciadores que se muestran en la Tabla IX

Tabla IX
Iniciadores utilizados para determinar las variantes del gen *CD32*

Variante polimórfica	Iniciadores	Secuencia(5'-3')	Temperatura	Tamaño (pb)
<i>H131</i> <i>FCGR</i>	Sentido Antisentido	ATCCCAGAAATTCTCCCA CAATTTTGCTGCTATGGGC	57° C	253
<i>R131</i> <i>FCGR</i>	Sentido Antisentido	ATCCCAGAAATTCTCCCG CAATTTTGCTGCTATGGGC	57° C	253
<i>HGH-I</i> <i>HGH-II</i>	Sentido Antisentido	ACCTGTACTCTCCACTGTCGTT CACGGATTTCTGTTGTGTTTC	57° C	423

Se indica la temperatura de hibridación del iniciador al molde de ADN y el tamaño del producto amplificado correspondiente.

Se amplificó como control interno de la PCR el gen de la hormona de crecimiento (*HGH*).

Para la realización de la amplificación se preparó una mezcla de reacción, que consistió en: 10,65 µL de agua destilada, 2 µL PCR Buffer (1X), 0.1µM de los iniciadores de H/R¹³¹, 0.1 µM de los iniciadores de *HGH-I* y *HGH-II*, 1 µL de KCl (2.5 mM), 0,4 µL de Tris-HCl (0,4 mM), 0,4 µL de dNTPs (0,2 mM), 1,3 µL de MgCl₂ (3,3 mM), 0,25 µL de Taq

polimerasa (1,25 U/ml) (Taq platinum, Invitrogen) y 2µL de ADN genómico (200 µg/ml). El volumen total por reacción fue de 20µL. Se incluyó un control negativo (mezcla de reacción sin ADN) para descartar contaminación.

Las siguientes condiciones fueron utilizadas para la amplificación: 95°C por 5 minutos, seguido por 10 ciclos con las siguientes características: desnaturalización a 95°C por 1 minuto, hibridación a 57°C por 2 minutos y extensión a 72°C por 1 minuto. Seguidamente se realizó 22 ciclos con las siguientes características: desnaturalización a 95°C por 1 minuto, hibridación a 54°C por 2 minutos y extensión a 72°C por 1 minuto. Después de realizar el número de ciclos señalados, la etapa de extensión final se realizó a 72°C por 5 minutos.

El producto de PCR de los genes *CD32* y *HGH*, de 253pb y 423pb, respectivamente se verificó en geles de agarosa al 2% (Sigma), teñidos con bromuro de etidio. La corrida se realizó a 100 voltios por 30 minutos. Se utilizó como referencia un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Axygen).

PCR- SSP del gen *FCGR3B* (*CD16*).

El gen *FCGR3B* que codifica el receptor CD16, existe en dos formas alélicas, conocidas como *FCGR3B1* (*CD16-NA1*) y *FCGR3B2* (*CD16-NA2*), que difieren en cinco nucleótidos (nucleótidos 141, 147, 227, 277 y 349), una de los cuales es una mutación silente. Estas formas alélicas fueron definidas siguiendo el protocolo reportado previamente (99). Para la amplificación de la variante NA1/NA2 se utilizaron los iniciadores reportados por Kuwano *et al* (Tabla X).

Tabla X
Iniciadores utilizados para determinar las variantes del gen CD16

Variante polimórfica	Iniciadores	Secuencia(5'-3')	Temperatura	Tamaño (pb)
NA1 FCGR	Sentido Antisentido	CTCAATGGTACAGGGTGCTC GGCCTGGCTTGAGATGAGGT	63° C	118
NA2 FCGR	Sentido Antisentido	CTCAATGGTACAGCGTGCTT CACCTGTACTCTCCACTGTCGTT	63° C	171
β-Globina F β-Globina R	Sentido Antisentido	CAACTTCATCCACGTCACC GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	63° C	286

Se indica la temperatura de hibridación del iniciador al molde de ADN y el tamaño del producto amplificado correspondiente.

Se amplificó como control interno de la PCR el gen de *β-globina*.

Para la realización de la amplificación se preparó una mezcla de reacción de 20 µL que consistió en: 10,65 µL de agua destilada, 2µL de PCR Buffer (1X), 0.5µM de los iniciadores NA1 y NA2, 0.1 µM de los iniciadores de *β-globina*, 1 µL de KCl (2,5mM), 0.4 µL de Tris HCl (0,4mM) 0.4µL de dNTPs (0.2mM), 1,3 µL de MgCl₂ (3,3mM), 0.25 µL de la enzima Taq polimerasa (1,25 U/ml) (Taq platinum, Invitrogen) y 2µL de ADN genómico (200 µg/ml). Se incluyó un control negativo (mezcla de reacción sin ADN) para descartar contaminación. Las siguientes condiciones fueron utilizadas para la amplificación: 94°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos con las siguientes características: desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación a 63°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto. Después de realizar el número de ciclos señalados, la etapa de extensión final se realizó a 72°C por 10 minutos.

El producto de PCR (118pb para NA1 o 171pb para NA2) se verificó en geles de agarosa al 2% (Sigma), teñidos con bromuro de etidio (0,5µg/ml). La corrida se realizó a 100 V por 30 minutos, utilizando como referencia un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Axygen).

Analisis estadístico

Se realizó la prueba de equilibrio para la distribución genotípica en el grupo control de acuerdo a Hardy-Weinberg (H-W). La significancia (p) del desequilibrio de los genotipos se calculó con la prueba de χ^2 de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\chi^2 = \sum (O-E)^2/E$$

Donde O es el valor de las frecuencias observadas y E el valor de las frecuencias esperadas. La significancia (p) del mismo se buscó en la tabla de χ^2 con 1 grado de libertad. Usando el programa Max Lik basado en el método de verosimilitud (133).

El estudio comparativo entre los individuos controles y los individuos infectados con *P. vivax* para los polimorfismos mencionados fue realizado en base al cálculo de:

Frecuencia genotípica y alélica

Las frecuencias genotípicas son el resultado del conteo directo de los genotipos que poseen los individuos expresadas en porcentaje.

$$FG = n \times 100/N$$

Donde: FG= frecuencia genotípica

n= número de veces que se observa el genotipo

N= número total de individuos

Las frecuencias alélicas para cada gen, fueron obtenidas por conteo directo a partir de los genotipos asignados a cada individuo. Se determina el número de veces que se observa el alelo y se divide entre dos veces el número total de individuos estudiados.

$$FA = n/2N$$

Asociación

Se calcularon los valores de significancia (probabilidad p menor o igual a 0,05) mediante la prueba exacta de Fisher en tablas 2x2, para evaluar las diferencias entre los individuos control y los individuos infectados con *P. vivax* y establecer las asociaciones de los genes *CD32*, *CD16* con la infección. El valor de p corregida (p_c) se obtuvo multiplicando el valor de p por el número de comparaciones efectuadas (130).

$$X^2 = \frac{n \{ad-bc\} - \frac{1}{2} n)^2}{(a+c)(b+d)(a+b)(c+d)}$$

Donde: X^2 = Ji-Cuadrado con corrección de Yates

n= número total de individuos

a,b,c,d= valores numéricos de las celdas de la tabla 2x2

Odds Ratio

Estima cuantas veces más frecuentemente ocurre la enfermedad en los individuos portadores de los genotipos en cuestión, con respecto al grupo de individuos que no lo tienen. El OR se calculó de acuerdo con la formula de Woolf (134) y para los casos que presentaron valores iguales a cero se aplicó la formula modificada por Haldane (135)

$$OR = \frac{\text{Odds de exposición en casos}}{\text{Odds de exposición en controles}} = \frac{a/b}{c/d} = \frac{ad}{bc}$$

$$\text{Odds de exposición en casos} = a \times (a + b) / b \times (a + b) = a/b$$

$$\text{Odds de exposición en controles} = c \times (c + d) / d \times (c + d) = c/d$$

Donde:

	Factor de riesgo Presente	Factor de riesgo Ausente	Total
Casos	A	B	a + b
Control	C	D	c + d
Total	a + c	b + d	

a= número de pacientes positivos para el factor de riesgo (alelo, genotipo, combinación)

b= número de pacientes negativos para el factor de riesgo

c= número de individuos sanos positivos para el factor de riesgo

d= número de individuos sanos negativos para el factor de riesgo

RESULTADOS

Distribución de la población según los municipios estudiados

Al realizar el análisis de la distribución de la población según los municipios, observamos que la mayoría de los individuos procedían del municipio Ribero (sanos: 27,77% e individuos infectados por *P. vivax*: 24,73%) (Tabla XI).

Tabla XI

Distribución de la población según los municipios estudiados

Municipios	Individuos		Individuos	
	Sanos		Infectados	
	n=54	%	<i>P.vivax</i> n=93	%
ARISMENDI	9	16,66	16	17,20
BERMÚDEZ	11	20,37	18	19,35
BENÍTEZ	8	14,81	19	20,43
CAJIGAL	11	20,37	17	18,27
RIBERO	15	27,77	23	24,73

Nota: En los individuos sanos n=54 es el 100%, en los individuos infectados con *P.vivax* n=93 es el 100%

Examen parasitológico

El análisis del examen parasitológico (gota gruesa y extendido), mostró que los 54 individuos presuntamente sanos eran negativos para parásitos *P. vivax*. En los 93 individuos con malaria, las infecciones por *P. vivax* fueron confirmadas por Salud Ambiental-Contraloría Sanitaria (Malariología), así como en la consulta de malaria en los diferentes municipios, a través de gota gruesa y extendido (Figuras 7 y 8)



Figura 7. Visualización de la muestra de sangre en lámina portaobjeto, a.- gota gruesa y b.- extendido.

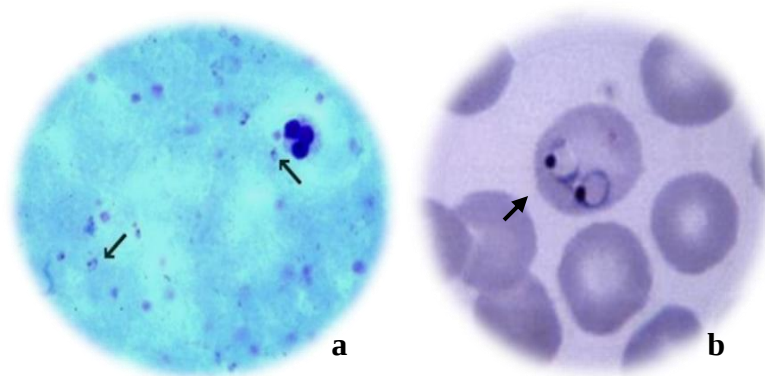


Figura 8. Visualización del *plasmodium* en examen parasitológico (a.-gota gruesa y b.- extendido)

Detección de antimaláricos en orina de individuos sanos

El análisis de antimaláricos en orina mostró que los 54 individuos presuntamente sanos eran negativos para los antimaláricos cloroquina (CQ) y su principal metabolito, la desetilcloroquina (DCQ), quinina (QUIN) y amodiaquina (AMO). (Figura 9)

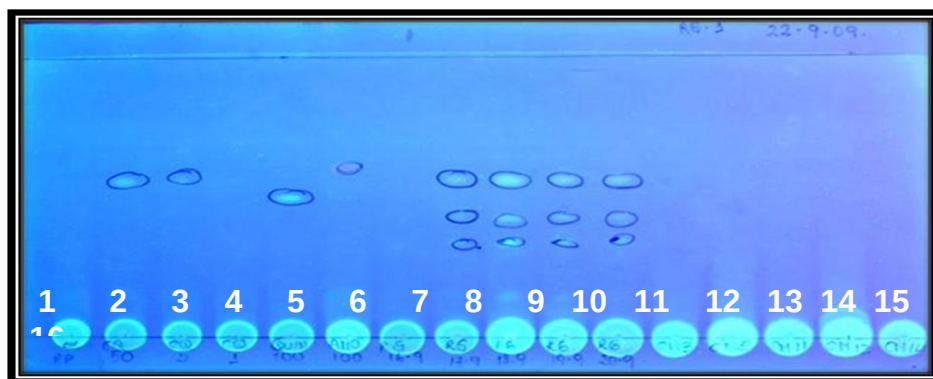


Figura 9. Visualización de las muestras de orina en placa de aluminio recubierta con sílica gel (Merk-art 5553). El pozo 1 corresponde al control negativo. Los pozos 2 al 6 corresponden a los antimaláricos, el pozo 7 corresponde a control negativo, los pozos 8 al 11 corresponden al control positivo y los pozos 13 al 16 corresponden a las muestras de los individuos sanos.

Evaluación de la Integridad del ADN

En la Figura 10 se muestra los ADN genómicos de algunos de los individuos incluidos en el estudio. En cada carril del gel se colocó 2µl de buffer de carga mezclado con 5µl de ADN, cuya concentración fue previamente ajustada a 200 µg/ml. En uno de los carriles se colocó como control 5µl (200 µg/ml) de fago lambda (Promega) sin digerir.

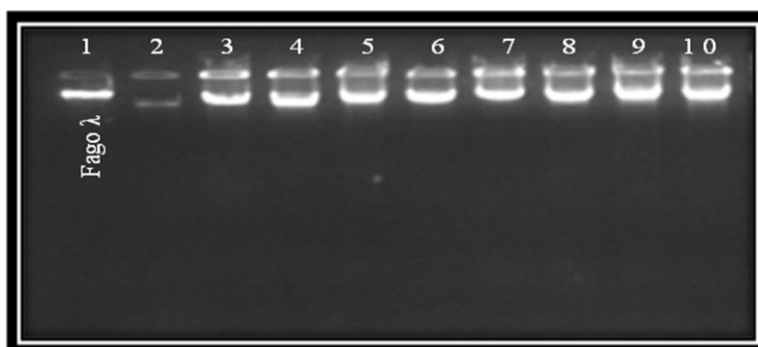


Figura 10. Evaluación de la integridad del ADN genómico. El pozo 1 corresponde al fago lambda ajustado a 200 µg/ml (marcador de referencia) y los pozos 2 al 10 corresponden a muestras de ADN de individuos, ajustadas a una concentración de 200 µg/ml.

Genotipaje del grupo sanguíneo Duffy en individuos sanos

En la figura 11,12, 13 y 14 se muestra un gel representativo de los productos del PCR del gen Duffy variante *Fya*, variante *Fyb*, variante *FY* (alelo nulo, silente) y variante *FY* (alelo nulo, silente en grupos étnicos negros), respectivamente.

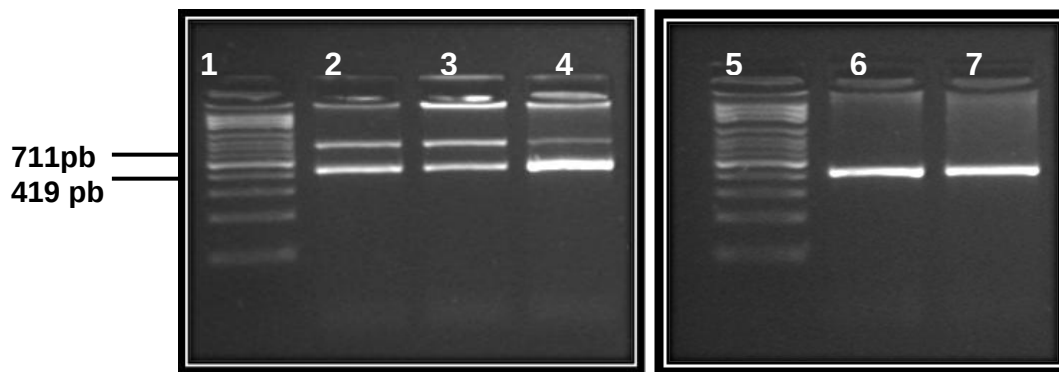


Figura 11. Visualización de los productos amplificados por PCR del gen Duffy para la variante *Fya*, en un gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X coloreado con bromuro de etidio (sigma). El pozo 1 y 5 corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb (Ladder DNA marker) para determinar el tamaño del producto amplificado. Los pozos 2 al 4 corresponden a muestras de individuos donde se muestra la presencia de la banda de ABO (control interno) y la presencia de la banda correspondiente al alelo *Fya*. Los pozos 6 y 7 corresponden a muestras de individuos negativos para el alelo *Fya*.

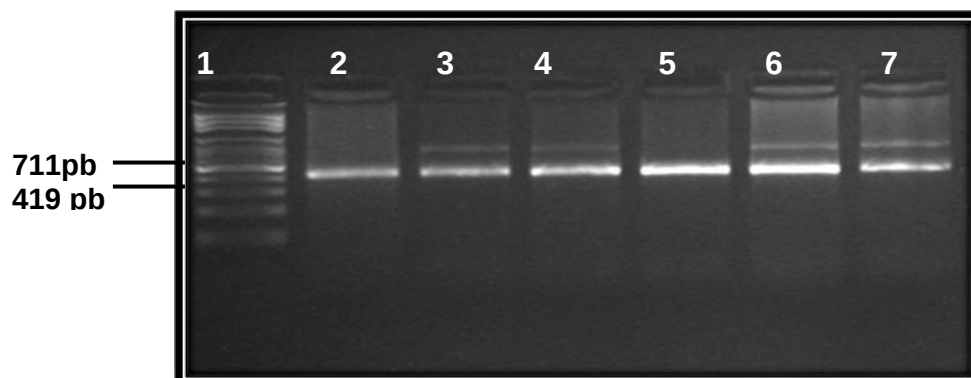


Figura 12. Visualización de los productos amplificados por PCR del gen Duffy, variante *Fyb*, en un gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X coloreado con bromuro de etidio

(sigma). El pozo 1 corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb (Ladder DNA marker) para determinar el tamaño del producto amplificado. Los pozos 3-4, 6-7 corresponden a muestras de individuos sanos donde se muestra la presencia de la banda de *ABO* (control interno) y la presencia de la banda correspondiente al alelo *Fyb*. Los pozos 2 y 5 corresponden a muestras de individuos negativos para el alelo *Fyb*.

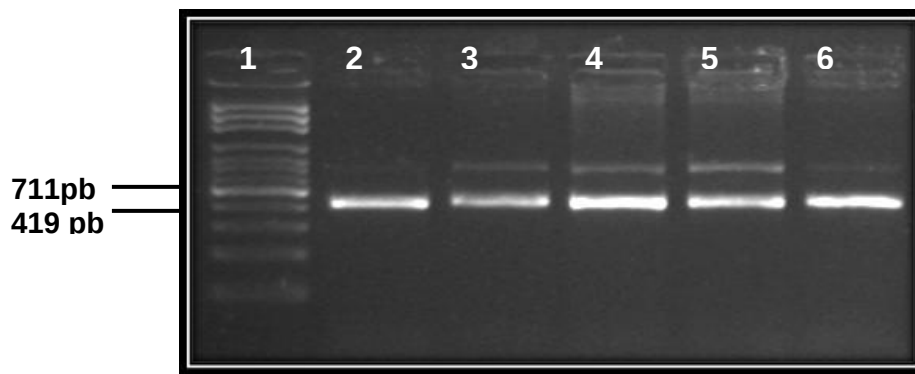


Figura 13. Visualización de los productos amplificados por PCR del gen Duffy, variante *FY* (alelo nulo, silente) en un gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X coloreado con bromuro de etidio (sigma). El pozo 1 corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb (Ladder DNA marker) para determinar el tamaño del producto amplificado. Los pozos 2 al 6 corresponden a muestras de individuos sanos donde se muestra la presencia de la banda del gen *ABO* (control interno) y la presencia y/o ausencia de la banda correspondiente al alelo *FY* alelo nulo, silente.

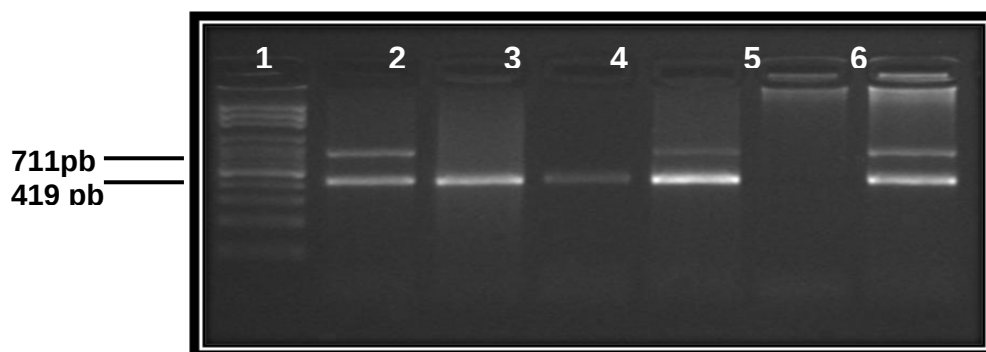


Figura 14. Visualización de los productos amplificados por PCR del gen Duffy, variante *FY* (alelo nulo, silente en grupos étnicos negros), en un gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X coloreado con bromuro de etidio (sigma). El pozo 1 corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb (Ladder DNA marker) para determinar el tamaño del producto

amplificado. Los pozos 2 al 6 corresponden a muestras de individuos sanos donde se muestra la presencia de la banda del gen *ABO* (control interno) y la presencia y/o ausencia de la banda correspondiente al alelo nulo o silente *FY*, característico de grupos étnicos negros.

Al realizar el análisis genotípico del grupo sanguíneo Duffy, observamos que estaban presentes los cuatro genotipos y fenotipos posibles. Siendo el genotipo y fenotipo más frecuente el $Fy(a-b+)$ y $Fy^b Fy^b$, respectivamente. Presentando el alelo Fy^b la mayor frecuencia, seguido por el alelo Fy^a . (Tabla XII)

De las 54 muestras de individuos presuntamente sanos, tres de ellas no amplificaron para el control interno ni para el grupo sanguíneo Duffy, quedando un total de 51 muestras. De estas 51 muestras, siete resultaron Duffy negativos, con un genotipo $Fy Fy$ y fenotipo Fy (a-b-). De los siete individuos Duffy negativos, cuatro presentaron el alelo nulo silente característico de caucásicos y tres el alelo nulo silente característico de grupos étnicos negros. Los individuos Duffy negativos fueron excluidos del grupo control, ya que se ha reportado que dichos individuos son resistentes a la infección por *Plasmodium vivax* (116), quedando en total 44 individuos presuntamente sanos.

TABLA XII

Distribución de las frecuencias fenotípicas, genotípicas y alélicas del grupo sanguíneo Duffy en individuos sanos determinación de la presencia del parásito *Plasmodium sp.* en individuos sanos

Genotipos	Fenotipos	Individuos		Alelos		
		n=51	%		n= 102	%
$Fy^a Fy^a$	Fy(a+b-)	14	27,45	Fy^a	40	39,21
$Fy^b Fy^b$	Fy(a-b+)	18	35,29	Fy^b	48	47,05
$Fy^a Fy^b$	Fy(a+b+)	12	23,52	Fy	14	13,72
$Fy Fy$	Fy (a-b-)	7	13,72			

Para confirmar que los 44 individuos presuntamente sanos, que eran positivos para el grupo sanguíneo Duffy y negativos para antimaláricos, no habían sufrido infección por *P. vivax* o *P. falciparum*, realizamos la detección del ADN mitocondrial de este parásito por PCR.

En la figura 15 y 16 se muestra un gel representativo de los productos del PCR del ADN mitocondrial de *P.vivax* y del ADN mitocondrial de *P. falciparum*, respectivamente

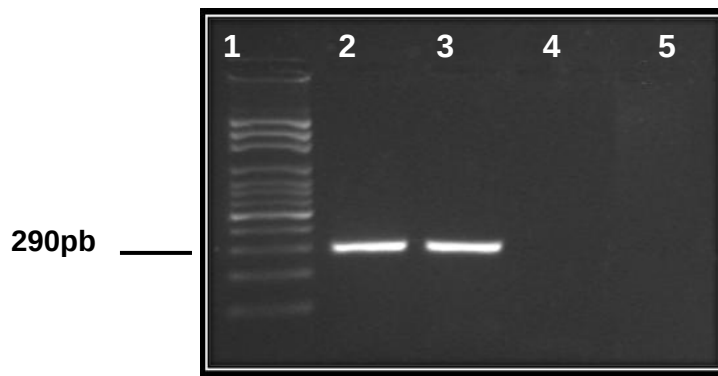


Figura 15. Visualización de los productos amplificados por PCR del ADN mitocondrial de *P.vivax*, en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 1X coloreado con bromuro de etidio (sigma). El pozo 1 corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb (Ladder DNA marker) para determinar el tamaño del producto amplificado. Los pozos 2 y 3 corresponden al ADN mitocondrial de *P.vivax* de los controles positivos y los pozos 4 y 5 corresponden a muestras de individuos sanos.

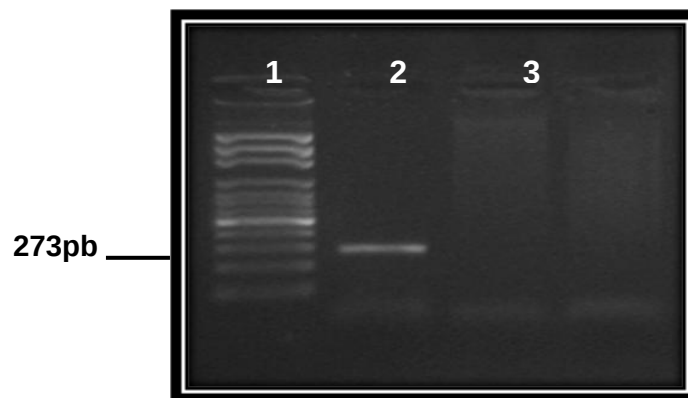


Figura 16. Visualización de los productos amplificados por PCR del ADN mitocondrial de *P. falciparum*, en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 1X coloreado con bromuro de etidio (sigma). El pozo 1 corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb (Ladder DNA marker) para determinar el tamaño del producto amplificado. El pozo 2 corresponde al ADN mitocondrial de *P.falciparum* (control positivo) y los pozos 3 y 4 corresponden a muestras de individuos sanos.

Cinco de los individuos resultaron positivos para *P. vivax*, los cuales se excluyeron del grupo control, quedando en definitiva 39 individuos sanos. Cabe destacar que este es un método con alta sensibilidad y especificidad para la detección de parásitos *Plasmodium* (Tabla XIII).

Tabla XIII

Detección de parásitos *Plasmodium* (*vivax* y *falciparum*) en muestras de individuos presuntamente sanos

<i>Plasmodium</i>	Muestras de individuos sanos (n=44)		
	Positivos	Negativos	Total
<i>P. vivax</i>	5 (11.36)	39 (88.63)	44
<i>P. falciparum</i>	0	44 (100)	44

NOTA: Los valores mostrados entre paréntesis representan el porcentaje

Determinación de IgG específicas a *Plasmodium vivax* en plasma de individuos sanos

Al realizar la determinación de IgG específica a *Plasmodium vivax* en plasma de los 39 individuos presuntamente sanos, confirmamos que ninguno de ellos poseía anticuerpos específicos contra *Plasmodium vivax*.

Determinación de los niveles de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) en sangre de individuos sanos

Una vez confirmado que de 54 individuos presuntamente sanos, 39 eran positivos para el grupo sanguíneo Duffy, negativos para antimaláricos y negativos a la infección por *P. vivax* o *P. falciparum* por PCR, se realizó una nueva salida de campo para tomar una segunda muestra de sangre, con el fin de determinar los niveles glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) en estos individuos. De los 39 individuos solo se pudo contactar 34 porque cinco de ellos no se encontraban en el Estado Sucre en el momento de la consulta. Se confirmó que los 34 individuos poseían niveles normales de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Estimación del equilibrio de Hardy Weinberg para la distribución genotípica de los polimorfismos estudiados en individuos sanos

La prueba de H-W se estimó para cada sitio polimórfico por separado, ya que se desconoce la fase gamética por ausencia de los datos familiares asociados a cada muestra. Se pudo constatar la no existencia de equilibrio de Hardy-Weinberg para la distribución genotípica de los sitios polimórficos estudiados en los genes *FCGRIIA* (*CD32*) y *FCGRIIB* (*CD16*) (Tabla XIV)

Tabla XIV
Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg para los polimorfismos estudiados en individuos venezolanos sanos

Polimorfismo estudiado	X²	p de Fisher, lg.l.
<i>H/R</i> ¹³¹	-----	-----
<i>NA1/NA2</i>	12,2304	*p<0,05

*significativo; g.l.: grado de libertad

Polimorfismo NA1/NA2 del gen *FCGRIIB* (*CD16*) en individuos sanos e individuos infectados con *P. vivax*

En la figura 17 y 18 se muestra un gel representativo de los productos del PCR para la variante NA1 y NA2 del gen *CD16*, respectivamente.

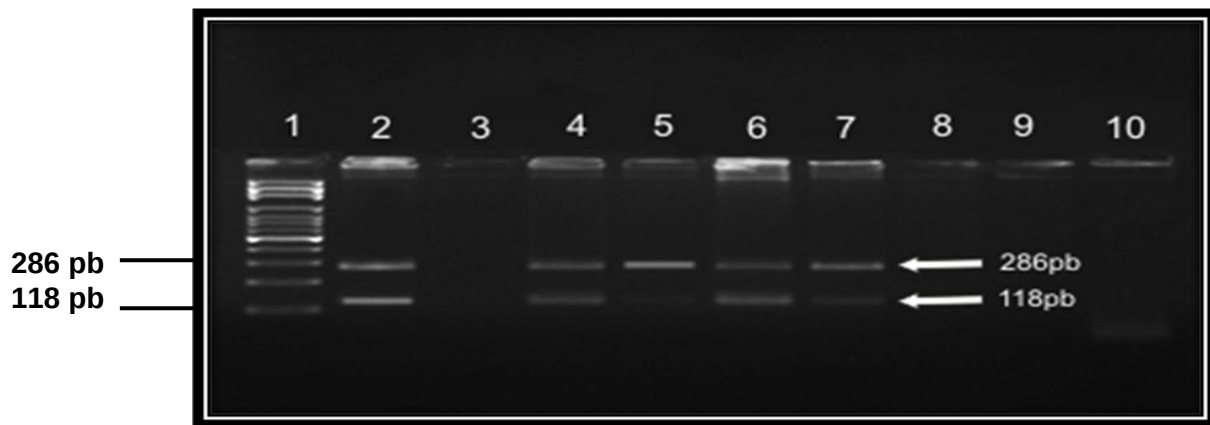


Figura 17. Visualización de los productos amplificados por PCR de los genes *CD16*, variante NA1, y β -globina en un gel de agarosa al 2% en búffer TBE 1X coloreado con bromuro de etidio (sigma). El pozo 1 corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb (Ladder DNA marker) para determinar el tamaño del producto amplificado. Los pozos 2 al 7 corresponden a de individuos donde se muestra la presencia de la banda de β -globina (control interno) y la presencia y/o ausencia de la banda correspondiente al alelo NA1

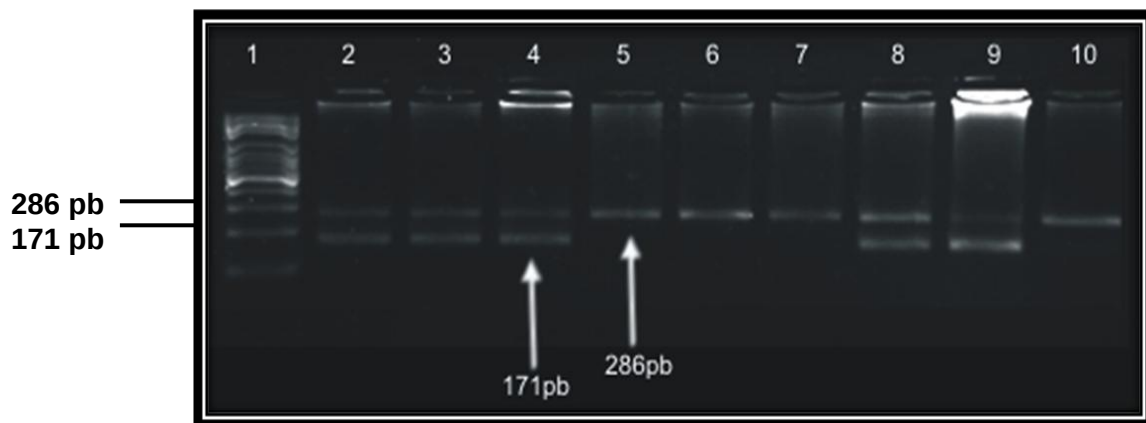


Figura 18. Visualización de los productos amplificados por PCR de los genes *CD16*, variante NA2, y β -globina en un gel de agarosa al 2% en búffer TBE 1X coloreado con bromuro de etidio (sigma). El pozo 1 corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb (Ladder DNA marker) para determinar el tamaño del producto amplificado. Los pozos 2 al 10 corresponden a muestras de individuos donde se muestra la presencia de la banda de β -globina (control interno) y la presencia y/o ausencia de la banda correspondiente al alelo NA2.

En ambos grupos (infectados y sanos) se detectó la presencia de solo dos de los tres genotipos posibles: NA1/NA1 y NA1/NA2, siendo el genotipo heterocigoto NA1/NA2 el más frecuente. Al comparar las frecuencias genotípicas entre los individuos infectados con *P. vivax* e individuos sanos, así como las frecuencias alélicas no se observaron diferencias estadísticamente significativas (tabla XV)

Tabla XV
Frecuencias del polimorfismo NA1/NA2 del gen *CD16* en individuos sanos e individuos infectados con *P. vivax*

<i>CD16</i> (NA1/NA2)	Individuos sanos n=34	Individuos infectados <i>P.vivax</i> n= 93	OR IC 95 %	<i>P</i>
--------------------------	-----------------------------	---	---------------	----------

Genotipos

NA1/NA1	23.5 (8)	20.4 (19)	0.83	Ns
NA1/NA2	76.5 (26)	79.6 (74)	1.19	Ns

Alelos

NA1	61.8 (42)	60.2 (112)	0.93	Ns
NA2	38.2 (26)	39.8 (74)	1.06	Ns

NOTA: Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de veces que se repite el alelo o el número de individuos portadores de un genotipo para el sitio polimórfico estudiado. La frecuencia está expresada en porcentaje. p<0.05: significativo, ns: no significativo

Polimorfismo NA1/NA2 del gen *FCGR3B* (*CD16*) en individuos sanos e individuos infectados con *P. vivax* tomando en cuenta los episodios.

Los individuos infectados con *P.vivax*, independientemente del número de episodios, presentaron dos de los tres genotipos posibles: NA1/NA1 y NA1/NA2, siendo el genotipo heterocigoto NA1/NA2 el más frecuente, seguido por el genotipo NA1/NA1. Presentando el alelo NA1 una mayor frecuencia con respecto al alelo NA2. (Tabla XVI)

Tabla XVI

Frecuencias del polimorfismo NA1/NA2 del gen *CD16* en individuos sanos e individuos infectados con *P. vivax* tomando en cuenta los episodios.

<i>CD16</i> (NA1/NA2)	Individuos Sanos n=34	1 Episodio n= 35	2-6 Episodios N= 53	7 o más Episodios N=5
Genotipos				
NA1/NA1	23.5 (8)	20 (7)	18.9 (10)	40 (2)
NA1/NA2	76.5 (26)	80 (28)	81.1 (43)	60 (3)
Alelos				
NA1	61.8 (42)	60 (42)	59.4 (63)	70 (7)
NA2	38.2 (26)	40 (28)	40.6 (43)	30 (3)

NOTA: Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de veces que se repite el alelo o el número de individuos portadores de un genotipo para el sitio polimórfico estudiado. La frecuencia está expresada en porcentaje.

Al establecer comparaciones de las frecuencias genotípicas entre los individuos sanos y los diferentes grupos de pacientes, agrupados de acuerdo al número de episodios, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. (Tablas XVII-XVIII-XIX)

Tabla XVII

Frecuencias del polimorfismo NA1/NA2 del gen *CD16* en individuos sanos e individuos infectados con *P. vivax* tomando en cuenta 1 episodio

<i>CD16</i> (NA1/NA2)	Individuos Sanos n=34	1 Episodio n= 35	OR IC 95%	<i>P</i>
Genotipos				
NA1/NA1	23.5 (8)	20 (7)	0.83	Ns
NA1/NA2	76.5 (26)	80 (28)	1.19	Ns
Alelos				
NA1	61.8 (42)	60(42)	0.92	Ns
NA2	38.2 (26)	40(28)	1.07	Ns

NOTA: Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de veces que se repite el alelo o el número de individuos portadores de un genotipo para el sitio polimórfico estudiado. La frecuencia está expresada en porcentaje.
p<0.05: significativo, ns: no significativo

Tabla XVIII

Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo NA1/NA2 del gen *CD16* en individuos sanos e individuos que han presentado 2 a 6 episodios de infección por *P. vivax*

<i>CD16</i> (NA1/NA2)	Individuos Sanos n=34	2-6 Episodios n= 53	OR IC 95%	<i>P</i>
Genotipos				
NA1/NA1	23.5 (8)	18.9 (10)	0.75	Ns
NA1/NA2	76.5 (26)	81.1 (43)	1.32	Ns
Alelos				
NA1	61.8 (42)	59.4 (63)	0.90	Ns
NA2	38.2 (26)	40.6 (43)	1.10	Ns

NOTA: Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de veces que se repite el alelo o el número de individuos portadores de un genotipo para el sitio polimórfico estudiado. La frecuencia está expresada en porcentaje. p<0.05: significativo, ns: no significativo

Tabla XIX

Frecuencias del polimorfismo NA1/NA2 del gen *CD16* en individuos sanos e individuos infectados con *P. vivax* tomando en cuenta 7 episodios

<i>CD16</i> (NA1/NA2)	Individuos Sanos n=34	7 o más Episodios n=5	OR IC 95%	<i>P</i>
Genotipos				
NA1/NA1	23.5 (8)	40 (2)	2.16	Ns
NA1/NA2	76.5 (26)	60 (3)	0.46	Ns
Alelos				
NA1	61.8 (42)	70 (7)	1.44	Ns
NA2	38.2 (26)	30 (3)	0.69	Ns

NOTA: Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de veces que se repite el alelo o el número de individuos portadores de un genotipo para el sitio polimórfico estudiado. La frecuencia está expresada en porcentaje
p<0.05: significativo, ns: no significativo

Polimorfismo H/R¹³¹ DEL GEN *FCGR2A* (*CD32*) en individuos sanos e individuos infectados con *P. vivax*.

En la figura 19 se muestra un gel representativo de los productos del PCR para la variante H/R¹³¹ del gen *CD32*.

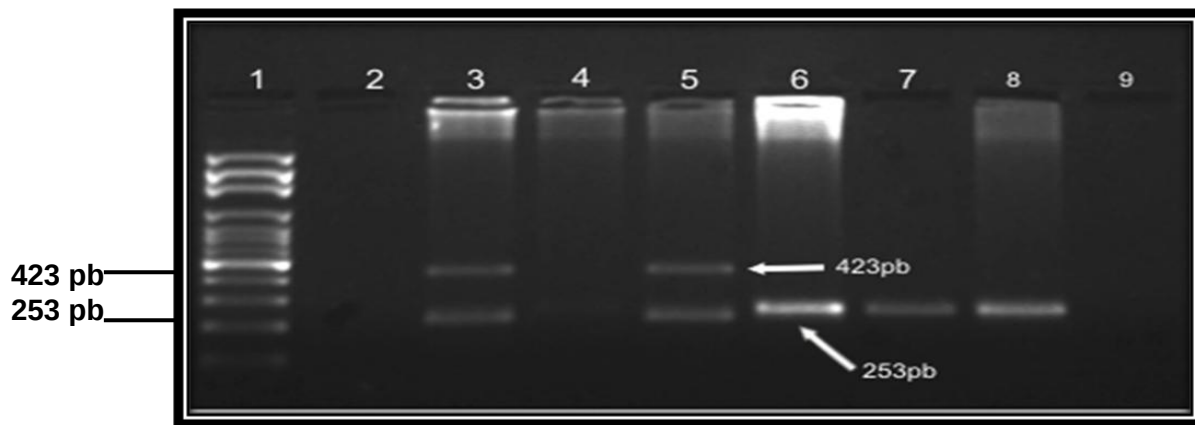


Figura 19. Visualización de los productos de amplificación (PCR) de los genes *CD32* H/R¹³¹ y *HGH* en un gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X, teñido con bromuro de etidio (sigma). En el pozo 1 se observa el marcador de peso molecular de 100pb (Ladder DNA marker) para determinar el tamaño del producto amplificado. Se incluyó, además, un control negativo para descartar contaminación (pozo 9). Los pozos 3 al 8 corresponden a muestras de individuos donde se observa la presencia del control interno (*HGH*) y la presencia y/o ausencia de las bandas correspondientes al alelo H¹³¹ o R¹³¹ (253pb), dependiendo del iniciador utilizado (H131 o R131)

En ambos grupos (infectados y sanos) se detectó la presencia de solo uno de los tres genotipos posibles: el genotipo heterocigoto H/R¹³¹.

Combinación de las variantes H/R¹³¹ Y NA1/NA2 en individuos sanos e individuos infectados con *P. vivax*

En la tabla se muestra la frecuencia de los genotipos resultantes de la combinación de los genotipos NA1/NA1 y NA1/NA2 del gen *FCGR2B* (*CD16*) con el genotipo heterocigoto H/R¹³¹ del gen *FCGR2A* (*CD32*) (Tabla XX). Al establecer comparaciones entre ambos grupos de individuos estudiados no se observaron diferencias significativas.

Tabla XX

Frecuencias de las combinaciones genotípica H/R¹³¹-NA1/NA2 en individuos sanos e individuos infectados con *P. vivax*

Genotipos CD32/CD16	Individuos Sanos n=34	Individuos infectados <i>P.vivax</i> n= 93	OR IC 95%	<i>P</i>
H/R¹³¹ - NA1/NA1	23.5 (8)	20.4 (19)	0.83	Ns
H/R¹³¹ -NA1/NA2	76.5 (26)	79.6 (74)	1.19	Ns

NOTA: Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores de un genotipo. La frecuencia está expresada en porcentaje. p<0.05: significativo, ns: no significativo

DISCUSIÓN

La infección por *Plasmodium vivax* provoca una respuesta inmune específica, estimulando la secreción de citoquinas de las células T y otras células mononucleares, que podrían tener un papel importante en la eliminación del parásito mediante la activación de los mecanismos inmunes efectores. Esta producción de citoquinas es un importante estímulo de la fagocitosis que mejora la eliminación de los eritrocitos parasitados, pero las citoquinas inflamatorias también median las alteraciones patológicas que determinan la manifestación de los síntomas. En la malaria por *P. vivax*, las citoquinas son liberados después de la ruptura de esquizontes, y se han detectado niveles elevados de TNF que es liberado en forma de pulsos en el paroxismo sincrónico de la malaria por *P. vivax* y que al parecer está involucrado en la patogénesis de la fiebre en la malaria. Además, en la malaria por *P. vivax* se han detectado otras citoquinas, incluyendo IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12. Recientemente, se demostró la participación de células T reguladoras en la infección por *P. vivax* sugiriendo que el equilibrio entre citoquinas pro y anti-inflamatorias se requiere para controlar las alteraciones patológicas. (136)

Además, la adquisición de inmunidad a parásitos de malaria del estado sanguíneo depende de mecanismos mediados por células y anticuerpos. La unión de anticuerpos citofílicos a células efectoras dispara respuestas efectoras que causan la muerte de los parásitos, tales como opsonización y fagocitosis de parásitos extracelulares o células rojas parasitadas (pRBC), y mecanismos igual a citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC), conocidos como inhibición celular dependiente de anticuerpos (ADCI) de parásitos intracelulares (55).

Dada que la infección por *P. vivax* afecta notablemente la actividad productiva de la población económicamente activa y el rendimiento escolar, acarreando obstáculos al desarrollo social y económico (4), se han desarrollado diferentes técnicas de diagnóstico.

Para realizar el diagnóstico de malaria hay que tomar en cuenta como eje fundamental el diagnóstico epidemiológico, clínico y parasitológico. La gota gruesa y el extendido, realizados en una misma lámina, constituyen la prueba de elección en el diagnóstico de la malaria (36, 122, 123). Este método tiene una sensibilidad (92-98%) y especificidad (85-99%) aceptables, además, permite la identificación de la especie y el estadio de desarrollo del parásito, suministra información sobre la viabilidad del parásito identificado e incluso permite la cuantificación de los parásitos (36). La microscopía (gota

gruesa y extendido) puede detectar 5-20 parásitos por μl^{-1} de sangre (137,138), pese a su sencillez y su bajo costo requiere microscopistas bien entrenados. Por ello, en nuestra investigación se realizó la gota gruesa y el extendido en 147 individuos, agrupados en 54 individuos sanos y 93 individuos que sufrieron infecciones por *P. vivax*, en estos últimos la infección fue confirmada por Salud Ambiental-Contraloría Sanitaria (Malariología).

Posteriormente, con la finalidad de verificar que los individuos sanos que participaron en el estudio no estaban consumiendo antimaláricos en forma profiláctica, y que la no infección por *P. vivax* era debida al consumo arbitrario de estos medicamentos, se realizó la determinación de antimaláricos en orina, no encontrándose ningún caso positivo, exceptuando los controles positivos utilizados. En Venezuela la distribución de antimaláricos está controlada por el Ministerio del Poder Popular para la Salud, corroborando que al menos en esta zona del país, no existe el consumo libre de antimaláricos.

Una vez descartado que los individuos aparentemente sanos no usaban antimaláricos, procedimos a utilizar un método de diagnóstico más sensible para detectar la presencia de parásitos *Plasmodium*, para ello utilizamos un simple y sensible método de PCR para la detección de *P. vivax* y *P. falciparum*, por la amplificación de una secuencia de ADN mitocondrial. El número de copias del genoma mitocondrial por células varía desde 100 hasta 1000, dependiendo del tejido y el organismo investigado (139, 140, 141). Se ha reportado que este método posee una sensibilidad y especificidad del 100%, demostrando que este puede ser un buen método de diagnóstico, sobre todo porque sólo implica un paso, lo que lo hace menos laborioso y más rápido en comparación con los de PCR anidada (127). En nuestro estudio 5 (11.36%) de los individuos que conformaban el grupo control sano, dieron positivos a *P. vivax*, sólo por PCR, indicando que una proporción de la población que vive en zonas endémicas puede estar infectada, aunque no necesariamente muestren la sintomatología característica de la infección. En Venezuela, la mayoría de los casos de malaria son causados por *Plasmodium vivax*, como lo indica el reporte epidemiológico semanal, donde se reporta que es 15,8% de las infecciones son por *P.vivax* y 0% por *P.falciparum* (22). Posteriormente, procedimos a determinar, en los individuos presuntamente sanos, la presencia de anticuerpos específicos contra *P. vivax* para confirmar que estos individuos no habían sufrido infección.

Dado que la malaria es la enfermedad infecciosa con mayor evidencia de asociación entre factores genéticos del hospedero y el genotipo del parásito, interfiriendo con el riesgo de infección y el desarrollo de complicaciones graves de la enfermedad, procedimos a

realizar la determinación de los niveles de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en los individuos presuntamente sanos, para confirmar que la no infección no se debía a la presencia de una mutación o polimorfismo en el hospedero que le estaría confiriendo una ventaja de sobrevivida al protegerle contra la infección, tal como ocurre con la deficiencia de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Recientemente, en un estudio caso-control se demostró que la deficiencia de G6PD, ya sea proporcionada por el fenotipo o el genotipo, se asocia con protección contra la infección por *P. vivax* (142).

Trabajos previos han reportado que el antígeno Duffy es el único receptor de *Plasmodium vivax*. Se ha reportado que individuos negros africanos y sus descendientes son resistentes a la infección por este parásito, resistencia debida a una mutación en la región promotora del gen *Duffy*, la cual bloquea su transcripción en los eritrocitos (143). La frecuencia de los fenotipos duffy positivos Fy (a+b+), Fy (a+b-) y Fy (a- b+) es elevada en Asia y en poblaciones de raza blanca, mientras que la frecuencia del fenotipo duffy negativo Fy (a-b-) es mayor en negros y en poblaciones africanas (144). Olsson y colaboradores reportaron que los alelos Fy^a y Fy^b estaban presentes en personas de origen europeo y asiático, mientras que el alelo Fy nulo estaba presente en glóbulos rojos de personas de origen africano (112). Otro estudio caso-control, el de Cavasini y colaboradores, reportó que las personas con fenotipos Fy (a+ b+), Fy (a+ b-) y Fy (a-b+) eran igualmente susceptibles a la infección por *P. vivax*, mientras que aquellos con el fenotipo Fy (a-b-) eran totalmente refractarios a este parásito (117). Asimismo, diferentes estudios han establecido asociaciones entre individuos con genotipos Fy^aFy^b y susceptibilidad a malaria y alta densidad de parásitos (115).

En virtud de ello, realizamos el genotipaje del grupo sanguíneo duffy en el grupo de individuos sanos. Al analizar nuestros resultados observamos los cuatro fenotipos posibles: Fy (a+b-), Fy (a-b+), Fy (a+b+) y Fy (a-b-), siendo los tres primeros fenotipos los más frecuentes en nuestra población. Sin embargo, siete individuos (13.72%) presentaron el fenotipo Fy (a-b-), los cuales fueron excluidos del estudio ya que reportes previos han indicado que los individuos con este fenotipo son totalmente refractarios a la infección por *P. vivax* (117)

Entre otros desórdenes hematológicos que pudiesen estar afectando la susceptibilidad a la infección por *Plasmodium*, cabe destacar que en el Estado Sucre la variante S de la hemoglobina está distribuida en nueve municipios, teniendo mayor incidencia en el Municipio Ribero, cuya capital es el pueblo de Cariaco, donde se ha reportado una frecuencia de 5,1% de heterocigotos HBB*A/HBB*S. Según este estudio la

frecuencia de portadores en el Estado Sucre es de 2,9% HBB*A/HBB*S; 0,5 HBB*A/HBB*C y 0,2 beta talasemia (145). No obstante, a pesar de la amplia distribución de la hemoglobina S en el estado Sucre, los individuos incluidos en nuestro estudio no eran portadores de esta variante de la hemoglobina, de acuerdo a los datos registrados en sus historias clínicas.

Una mayor comprensión de los mecanismos de inmunidad de la malaria ayuda considerablemente el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y de vacunación. El estudio de la genética es importante para comprender cómo son esos mecanismos de protección y mejorar nuestra comprensión de la patogénesis de esta compleja enfermedad (96)

Como una contribución a los aspectos señalados anteriormente, la realización de este trabajo presenta un aporte para tratar de comprender en la población venezolana, los posibles rasgos genéticos que pudiesen estar jugando un papel importante en la susceptibilidad y/o protección a la infección o a la clínica causada por el *P. vivax*.

Trabajos previos han reportado que el Fcγ designado como: FcγRIIA (CD32), se cree juega un papel importante en el desarrollo de las respuestas efectoras mediadas por monocitos y macrófagos contra los parásitos de malaria, específicamente los de los estadios sanguíneos (55). Debido a que el receptor FcγRIIA-H¹³¹ es el único alotipo que interactúa eficientemente con la IgG2 específica contra el parásito, este pudiese o no determinar la cooperación con la respuesta inmunitaria celular durante la malaria en su estadio sanguíneo (55).

Se han reportado variantes polimórficas que incrementan la expresión o afinidad de los receptores FcγR por su ligando, es decir, la porción Fc del subtipo IgG. Dichas variantes aumentan la habilidad de los receptores FcγR para unirse a isotipos IgG específicos, que pudiesen estar jugando un papel importante: 1.- en la inflamación mediada por complejos inmunes que contienen IgG y, 2.- en la susceptibilidad a infecciones específicas que pueden estar asociada con el desarrollo de enfermedades vasculares/inflamatorias (146).

Hasta la fecha se han descrito un número limitado de polimorfismos en el gen *CD32 (FCGR1A)*. Uno de estos polimorfismos guía a una sustitución de Arginina (R) por Histidina (H) en la posición 131 del receptor CD32, alterando su afinidad por su ligando (porción Fc de IgG) y disminuyendo su capacidad para unir anticuerpos del subtipo IgG2. Ambos alotipos H¹³¹ y R¹³¹ se unen a subtipos IgG1 e IgG3, pero se ha reportado que el alotipo H¹³¹ posee mayor afinidad para subtipos IgG2 e IgG3 con respecto al alotipo R¹³¹.

En este sentido se ha descrito que el alotipo H^{131} es esencial para la depuración de complejos inmunes que contienen subtipos IgG2 y la fagocitosis de microorganismos opsonizados con este subtipo de IgG (81,82). Como consecuencia, el polimorfismo R/ H^{131} está asociado con la predisposición a: 1.- enfermedades autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico y síndrome antifosfolípido, que resultan de la deposición de complejos inmunes (83), 2.- infecciones causadas por bacterias encapsuladas, cuyo eliminación depende, en gran medida, de la fagocitosis mediada por IgG2 (84, 85).

Con respecto a la malaria varios estudios han establecido asociaciones de diferentes alelos de los genes *FCGRs* y malaria grave por *P. falciparum*. Shi, y colaboradores observaron que en zonas de alta densidad de parásitos, los niños que poseían el genotipo *CD32-R/R*¹³¹ eran significativamente menos propensos a la infección por *P. falciparum*, en comparación con los lactantes con el genotipo *CD32-H/R*¹³¹ (118) Considerando que el receptor CD32 está implicado en el desarrollo de la malaria y que la variante R/ H^{131} disminuye la afinidad del receptor por anticuerpos del subtipo IgG2, se podría inferir que la presencia de dicho genotipo puede conferir protección de la enfermedad por malaria.

Cabe mencionar, tres estudios casos-control que demostraron una significativa asociación entre individuos homocigotos H/H^{131} y la incrementada morbilidad a *P. falciparum* en diferentes poblaciones (96, 98, 147). Estas evidencias podrían explicarse como consecuencia de un incremento de la activación del sistema inmune, debido al acoplamiento de *CD32-H*¹³¹ a un amplio repertorio de subclases de IgG, conllevando a la liberación de altas concentraciones de citoquinas pro-inflamatorias que favorecen mecanismos patogénicos que conducen al desarrollo de enfermedades vascular-inflamatorias (96).

Otro estudio caso- control, estudiaron el polimorfismo *CD32- H/R*¹³¹ en niños que presentaban malaria aguda, pero no se observó que estuviese implicado con el desarrollo de anemia grave por malaria (119). Nasr y colaboradores estudiaron este mismo polimorfismo en grupos étnicos Fulani y no Fulani del este de Sudán y concluyeron que el genotipo R/ H^{131} estaba asociado con un mayor riesgo a desarrollar malaria severa, (148), en contraste en individuos de la India, el genotipo H/H^{131} al parecer protege contra la manifestación de la enfermedad (149).

Aunque el impacto del polimorfismo H/R^{131} en la evolución clínica de la malaria ha sido demostrado en varios estudios realizados en diferentes poblaciones del mundo (África y Asia) (95, 96, 98, 118, 149, 150, 151, 152). Nasr y colaboradores, reportaron la importancia de las diferencias genéticas entre las poblaciones estudiadas, así como

diferencias en genes, medio ambiente y patrones de transmisión de la malaria en las diferentes áreas de estudio (152).

Considerando el papel del polimorfismo del gen *CD32* en la malaria por *P. falciparum*, quisimos analizar el polimorfismo H/R¹³¹ de este gen en pacientes con malaria por *P. vivax*, así como el polimorfismo Na1/Na2 del gen *CD16*.

Al analizar el polimorfismo del gen *CD32*, observamos la presencia de un solo genotipo, el genotipo heterocigoto H/R¹³¹, en la población estudiada del Estado Sucre, en contraste a los resultados encontrados en población venezolana general, en la cual se observó la presencia de los tres genotipos: H/H¹³¹, R/R¹³¹ y H/R¹³¹, presentando el genotipo heterocigoto H/R¹³¹ la mayor frecuencia (Datos no publicados, Guadarrama 2010) (153). En Venezuela hay muy pocos estudios que estiman el mestizaje, esos estudios proporcionan resultados notoriamente diferentes de acuerdo a la región analizada, porque aunque hubo un proceso de mestizaje intenso en el país, éste no fue homogéneo a través del territorio. Datos de diferentes regiones del país (Tabla XXI) muestran que el componente europeo es siempre el más alto, sobre un 42%, mientras que el mayor componente nativo americano estimado es de 35%. Siendo el componente Africano el más variable, con valores entre 0 y 25% (154).

Tabla XXI
Estimación del porcentaje de mestizaje en diferentes poblaciones venezolanas

	Características de la población	n	N. Am	Eur.	Afr.	Referencia
Distrito Federal	Alto Estatus Social	60	10%	85%	5%	Martínez (3)
Distrito Federal	Bajo Estatus Social	50	35%	46%	19%	Martínez (2003)
Sucre y Nueva Esparta		75	17%	65%	18%	Vívenes de Lugo et al. (2004)
Multi-regional	Diferentes regiones de Venezuela	997-7842	24-33%	42-73%	0-25%	Rodríguez-Larralde et al. (2001)
Miranda	Población de Panaquire descendientes en su mayoría Africanos	75	26%	15%	59%	Castro de Guerra et al. (1996)

Simmons y col., 2007. n= el número de individuos estudiados; N. Am: Componente Indígena; Eur: Componente Europeo; Afr: Componente de Africano

Como se puede observar en la tabla anterior, la población del estado Sucre posee un alto porcentaje de componente europeo (65%), seguido por el componente africano (18%) y nativo americano (17%) (155). Estudios previos han demostrado que el estado Sucre muestra uno de los niveles más altos en la diversidad de haplotipos intrapoblacional (62%) (156). Hoy en día, las personas descendientes de europeos tienden a habitar las ciudades más grandes de Venezuela, como Caracas, Valencia y Maracaibo, mientras que las personas descendientes de africanos viven cerca de la costa y los nativos americanos, por lo general, viven en las zonas más remotas y aisladas del país, como el Amazonas y los estados Apure, Anzoátegui, Bolívar, Delta Amacuro, Monagas, Sucre y Zulia (154)

La distribución de los alotipos CD32-H¹³¹ y -R¹³¹ varía ampliamente entre grupos étnicos. Los homocigotos H¹³¹/H¹³¹ son más frecuentes entre asiáticos orientales que en caucásicos (157), siendo muy raro en amerindios de Amazonia (99). Mientras, que la frecuencia de la variante R¹³¹/R¹³¹ varía significativamente, siendo poco común en poblaciones de Asia (6-10%) con respecto a poblaciones de África, Europa, India, Norte y Sur América (23-37%) (98, 158). Considerando el mestizaje que ha sufrido nuestra población vemos que las frecuencias de los genotipos H/R¹³¹ (52,24%), R¹³¹/R¹³¹ (30,60%) y H131/H131 (17,16%) observados en población venezolana general (Datos no publicados, Guadarrama 2010) (153), no difieren significativamente de las frecuencias reportadas en Americanos-Africanos [H/R¹³¹ (44,9%), R¹³¹/R¹³¹ (36,4%) y H¹³¹/H¹³¹ (18, 6%)] y Caucásicos [H/R¹³¹ (42,4%), R¹³¹/R¹³¹ (33,9%) y H¹³¹/H¹³¹ (23, 6%)] (159). Sin embargo, a pesar del alto porcentaje del componente europeo en el Estado Sucre (155), observamos en la población que estudiamos de dicho estado la presencia de un solo genotipo, el genotipo heterocigoto H/R¹³¹, muy diferente a lo reportado en la literatura.

Los aloantígenos de neutrófilos están asociados con muchas condiciones de neutropenia clínica e inmunológica, insuficiencia respiratoria relacionada con la transfusión (TRALI), la refractariedad a transfusión de granulocitos, y las reacciones febriles a la transfusión. En la última década ha progresado considerable la caracterización de aloantígenos que participan en estas condiciones clínicas. En la actualidad siete antígenos son asignados a cinco sistemas de antígenos de neutrófilos humanos (HNA). Los antígenos HNA-1a, HNA-1b y HNA-1c fueron identificados como formas polimórficas de FcγRIIIb (CD16b), codificadas por tres alelos. (160).

Para el gen *CD16* se han reportado tres formas alélicas: NA1, NA2 y HNA-1c (SH). El polimorfismo NA1/NA2 del gen *CD16* ha sido estudiado por la marcada influencia que ejercen sobre la capacidad fagocítica de los neutrófilos. Se ha descrito que los neutrófilos con el genotipo NA2/NA2 presentan una actividad fagocítica más baja con respecto al genotipo NA1/NA1. Por otra parte, los receptores CD16 y CD32 pueden estar simultáneamente relacionados para iniciar las señales de la activación celular. De tal manera, que el polimorfismo de *CD16* designado como *CD16*-NA1/NA2 dirige la función de CD32 de una manera alelo-específica. Por lo tanto, neutrófilos con el genotipo *CD16*-NA2/NA2, muestran una menor actividad fagocítica mediada por CD32 que aquellos neutrófilos que presentan el genotipo homocigoto *CD16*-NA1/NA1 (81). En virtud de ello, estudiamos el polimorfismo del gen *CD16*. Al analizar nuestros resultados se observaron solo dos de los tres genotipos posibles: NA1/NA1 y NA1/NA2. En contraste a los

resultados encontrado en población venezolana general, en la cual se observó la presencia de los tres genotipos posibles: NA1/NA1, NA2/NA2 y NA1/NA2, siendo el genotipo heterocigoto NA1/NA2 el más frecuente (75,37%), seguido por el genotipo NA1/NA1 (21,64%) y finalmente el genotipo NA2/NA2 (2,99%) (Datos no publicados, Guadarrama 2010) (152). Al establecer comparaciones entre individuos sanos e individuos infectados con *P. vivax*, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Asimismo, al realizar el análisis comparativo entre la frecuencia de los genotipos en individuos sanos y pacientes con diferente número de episodios maláricos no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Omi y colaboradores, en un estudio caso-control asociado a malaria, no observaron una asociación significativa de los polimorfismos *CD32*-H/R¹³¹ ni *CD16*-NA1/NA2 con la severidad de malaria en individuos Tailandeses. No obstante, hallaron que la presencia del alelo NA2 y el genotipo homocigoto H/H¹³¹ estaban asociados con la susceptibilidad a malaria cerebral. Estos hallazgos sugieren que la combinación de las variantes *CD32*-H/R¹³¹ y *CD16*-NA1/NA2 tienen un efecto interactivo sobre la defensa del hospedero contra malaria (98). Sin embargo, al realizar el análisis comparativo de las frecuencias de las combinaciones genotípicas de la variante H/R131 del gen *CD32* con los genotipos de la variante NA1/NA2 del gen *CD16* en nuestros grupos de estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

A pesar que los resultados obtenidos sugieren que las variantes estudiadas, *CD32*-H/R¹³¹ y *CD16*-NA1/NA2, no están involucradas en la infección causada por el parásito *P. vivax*, este trabajo representa el primer estudio realizado en pacientes con malaria por *Plasmodium vivax*. Sin embargo, sería importante estudiar la variabilidad de otros genes candidatos (genes HLA, genes no HLA) que pudiesen estar jugando un papel importante en los mecanismos de defensa del hospedero contra la infección por *vivax* al afectar la inmunidad mediada por células y la estimulación de la cascada inmunológica protectora.

CONCLUSIONES

1.- La ausencia de infección por *P.vivax* en individuos con más de 10 años viviendo en municipios del estado Sucre, endémicos para malaria, no se debía: al consumo de antimaláricos en la población estudiada, a la ausencia del antígeno Duffy, a la presencia de hemoglobinopatías y a la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

2.- Los resultados obtenidos sugieren que las variantes estudiadas *CD32-H/R131* y *CD16-NA1/NA2* no están asociadas con susceptibilidad o protección a la infección o clínica causada por *P. vivax*. Sin embargo, no se puede descartar que la variabilidad de otros genes candidatos (genes HLA, genes no HLA) pudiesen estar jugando un papel importante en los mecanismos de defensa del hospedero contra la infección por *P. vivax* al afectar la inmunidad mediada por células y la estimulación de la cascada inmunológica protectora.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, la Doctora Mercedes Fernández-Mestre por incentivar me a recorrer este camino. Gracias por su confianza, apoyo y amistad.

Al Doctor Jaime Torres por la corrección y revisiones del manuscrito, así como por su comprensión y apoyo.

Al Doctor Oscar Noya González quien como excelente jurado de mi trabajo aportó sus valiosas sugerencias y conocimientos.

A la Dra. Aixa Muller, Dr. Andrés Soyano y a la Dra. Carmen Bracho, por su valiosa cooperación en la realización de este trabajo de grado.

A mis compañeros de laboratorio: Angela Guadarrama, Fernando Hernández, Ana Paula Bohórquez, Karen Sánchez, Violeta Ogando, Omar Balbás, Pierre-Antoine Deglesne, Elizabeth Da Mendoca, Frank Blanco, por brindarme su amistad.

A mi amiga María Reyes y su familia por su invaluable colaboración y apoyo.

Al señor Oscar Tineo por su colaboración invaluable en mi trabajo de campo.

A todos los individuos participantes por su disposición a contribuir con el avance del conocimiento en esta enfermedad.

A mis compañeros del laboratorio de Genética Humana del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

Al Instituto de Altos Estudios en Salud sobre Malaria por el privilegio de haber realizado entrenamiento en sus laboratorios y a todo el personal que labora en el instituto por su colaboración y apoyo.

Al Instituto de Medicina Tropical por el apoyo que me han brindado.

A la Universidad Central de Venezuela por el privilegio de haber realizado mis estudios de Postgrado en esta institución, y a todos los doctores que contribuyeron en mi formación académica.

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas-IVIC por el privilegio de haber realizado mi proyecto de investigación en esta institución.

Al personal del Centro de Estudios Avanzados del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas por su buena atención y disponibilidad.

Al Departamento de Fotografía Científica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas

A la Biblioteca Marcel Roche por su excelente servicio prestado.

Finalmente, al FONACIT por otorgarme la Beca para el desarrollo de mi Postgrado.

REFERENCIAS

1. Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW. The global distribution and population risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis.* 2004; 4(6): 327-36
2. WHO. World Malaria Report. RBM/ WHO/UNICEF. Geneva. 2005
3. Snow RW, Craig M, Marsh K. Estimating mortality, morbidity and disability due to malaria among Africa's non-pregnant population. *Bulletin WHO.* 1999; 77 (8)624-640
4. Mendis K, Sina B, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J. Trop. Med. Hyg.* 2001; 64 (1,2) S. 97-106
5. Ravetch J, Bolland S. IgG Fc Receptors. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19:275-290
6. Miller LH. Impact of malaria on genetic polymorphism and genetic diseases in Africans and African Americans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; 91: 2415 - 2419.
7. Harrison. Principios de medicina Interna. Décimo sexta edición en español por McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A de C.V. 2006
8. Breman JG. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants and estimates of the malaria burden. *Am. J. Trop. Med.* 2001; 64 (Suppl. 1-2): 1-11
9. Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJ, Targett GA "Malaria". *Lancet.* 2005; 365: 1487-1498
10. WHO. World Malaria Report. RBM/ WHO/UNICEF. Geneva. 2009.
11. Hay SI, Guerra CA, Gething PW, Patil AP, Tatem AJ, Noor AM, Kabaria CW, Manh BH, Elyazar IRF, Brooker SJ, Smith DL, Moyeed RA, Snow RW (2009). «A world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2007.

12. Gabaldón A, Berti A. The first large area in the tropical zone to report malaria eradication: North-Central Venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1954; 3:793-807
13. Aché A. Situación actual de la Malaria en Venezuela. *Boletín de la Dirección de Malariología Saneamiento Ambiental*. 1998; 38 (1): 68-72
14. OPS. La Salud en las Américas. Enfermedades y daños a la salud. Publicación Científica. 1998; N°. 569. Vol. I: 106-116.
15. Navarro JC. Actualización taxonómica de la tribu Anophelini de Venezuela con nueva clave para la identificación de larvas de 4to estadio. *Boletín de la Dirección de y Malariología Saneamiento Ambiental*. 1996; 36: 25-43
16. Osborn F, Rubio-Palis Y, Herrera M, Figuera A, Moreno J. Caracterización ecoregional de los vectores de la malaria en Venezuela. *Boletín de Malariología y Saneamiento Ambiental*. 2004; 44 (2): 77-92
17. Fleming G. Biología y ecología de los vectores de malaria de las Américas. Washington D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 1986.
18. Oletta J F, Carvajal A, Walter C. Red Defendamos la Epidemiología Nacional. Epidemia de malaria en el estado Bolívar Abril 2010: 1-11
19. Reporte epidemiológico regional. Estado Bolívar. Semana 14, Dirección de Salud Ambiental, Ministerio del Poder Popular para la Salud. Abril 2010.
20. Reporte epidemiológico regional. Estado Bolívar. Semana 13, Dirección de Salud Ambiental, Ministerio del Poder Popular para la Salud. Abril 2010.
21. Reporte epidemiológico regional. Estado Bolívar. Semana 15, Dirección de Salud Ambiental, Ministerio del Poder Popular para la Salud. Abril 2010.

22. Reporte epidemiológico semanal, semana 15, Dirección de Salud Ambiental, Ministerio del Poder Popular para la Salud 2012.
23. Delgado L, Ramos S, Gordon E, Martínez N, Zoppi E, Berti J, Montiel E. Nuevas perspectivas para el manejo de problemas de salud pública: Caso Particular La Malaria. Revista de la Facultad de Ingeniería, Universidad Central de Venezuela. 2004a.19 (3): 51-61
24. Delgado L, y Martínez N. “Relevancia de la variable socioeconómica actividad y empleo agrícola en la dinámica de la Malaria. Estado Sucre Venezuela”. XI Simposio Latinoamericano en Percepción Remota y Sistemas de Información Espacial (SELPER). Santiago de Chile, Chile, Memorias Selper en formato digital; 2004b.
25. Delgado L y Córdova K. 2007. “La importancia de la variabilidad climática en el manejo de enfermedades metaxénicas: malaria en el Estado Sucre, Venezuela”. XI Conferencia Iberoamericana de Sistemas de Información Geográfica (XI CONFIBSIG). Memorias en formato digital. 2007
26. Sánchez E, Vargas M, Piccolo C, Colina R, Arria M, Blanco J, Rodríguez A. Malaria por *Plasmodium vivax* en adultos hospitalizados en Carúpano estado Sucre 2000-2002. Salus militiae. 2004; 29(1/2):55-61
27. Delgado L, Ramos S, Martínez N. “Antropogénesis y persistencia de Malaria, Estado Sucre-Venezuela”. XI Simposio Latinoamericano en Percepción Remota y Sistemas de Información Espacial (SELPER). Santiago de Chile, Chile, Memorias Selper en formato digital; 2004c
28. Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, et al. A newly revised classification of Protozoa. 1980; 27(1):37-58
29. Garnham PCC. Malaria Parasites and other Haemosporidia. Blackwell. Oxford, RU. 1966; pp. 1113

30. Bruce-Chwatt LJ. Malaria in 1979. Union Med Can. 1980; 109 Suppl (2):14-7
31. Quintana JI. Malaria: Características generales y situación actual en Cuba y Las Américas. Reporte técnico de vigilancia. 2001; Vol. 6, No.5, Mayo 31, ISSN 1028-4338
32. Lobo CA, Kumar N. Sexual differentiation and development in the malaria parasite. Parasitol Today. 1998; 14(4):146-150
33. Sinden RE, Butcher GA, Billker O, Fleck SL. Regulation of infectivity of *Plasmodium* to the mosquito vector. Advances in Parasitol. 1996; 38: 54-117
34. Ponnudurai T, Billingsley PF, Rudin W. Differential infectivity of *Plasmodium* for mosquitoes. Parasitol Today. 1988; 4(11):319-21
35. Curtis H, Barnes NS, Schnexk A, Flores G. Biología. Sexta edición en español. Editorial médica panamericana. Buenos Aires. 2001
36. Bruce-Chwatt LJ. Essential Malariology. 2a ed. Heinemann Medical Books. Londres, RU. 1985; 452 pp.
37. Hankey DD, Jones R, Coatney R, Alving AS, Coker W, Garrison P, Donovan W. Korean vivax malaria. Natural history and response to chloroquine. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1953; 2: 958-969
38. Shute PG, Lupascu Gh, Branzei P, Maryon M, Constantinescu P, Bruce-Chwatt LJ, Draper CC, Killick-Kendrick R, Garnham PCC. A strain of *Plasmodium vivax* characterized by prolonged incubation: the effect of the number of sporozoites on the length of the pre-patent period. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1976; 70: 474-481
39. Oh MD, Shin H, Shin D, Kim U, Lee S, Kim N, Choi MH, Chai JY, Choe K. Clinical features of vivax malaria. Am J Trop Med Hyg. 2001 65(2):143-6.

40. Garnham PCC. Hypnozoites and "relapses" in *Plasmodium vivax* and in *vivax-like* malaria. Trop. Geogr. Med. 1988; 40: 187-195
41. Krotoski WA. The hypnozoite and malarial relapses. Prog. Clin. Parasitol. 1989;1:1-19
42. Sandoval de M M. Clínica de la malaria. Gac Méd Caracas. 1997; 105(1):27-29.
43. Karunaweera ND, Wijesekera SK, Wanasekera D, Mendis KN, Carter R. The paroxysm of *Plasmodium vivax* malaria. Trends Parasitol. 2003; 19(4):188-93
44. Hackett, L. W. La medición del bazo en la Malaria. Rev. Perú. med. exp. salud pública, dic. 1943, vol.2, no.4, p.305-319. ISSN 1726-4634.
45. Kelton JG, Keystone J, Moore J, Denomme G: Immune-mediated thrombocytopenia of malaria. J Clin Invest. 1983; 71:832
46. Yamaguchi S, Kubota T, Yamagishi T, Okamoto K, Izumi T, Takada M, Kanou S, Suzuki M, Tsuchiya J, Naruse T. Severe thrombocytopenia suggesting immunological mechanisms in two cases of *vivax* malaria. Am J Hematol. 1997; 56(3):183-6
47. Kumar A, Shashirekha. Thrombocytopenia an indicator of acute *vivax* malaria. Indian J Pathol Microbiol. 2006; 49(4):505-8.
48. Perrin LH, Mackey LJ and Miescher PA. The haematology of malaria in man. Seminars in Hematology 1982; 19(2):70-82.
49. Mendis K, Sina B, Marchesini P. Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. Am J. Trop. Med. Hyg. 2001; 64 (1,2) S. 97-106
50. Anstey MN, Tjandra Handojo, Michael C. F. Pain, Enny Kenangalem, Emiliana Tjitra, Ric N. Price, Graeme P. Maguire. Lung Injury in *vivax* Malaria: Pathophysiological Evidence for Pulmonary Vascular Sequestration and

Posttreatment Alveolar-Capillary Inflammation. The Journal of Infectious Diseases 2007; 195:589–96

51. Pedroza C. Gomez R. Diagnóstico por imagen, tratado de radiología clínica, radiología convencional, medicina nuclear, angiografía, ultrasonografía, tomografía computarizada, resonancia magnética. Volumen 2. México Mc Graw Hill. Interamericana. 1986
52. Martinez O. Síndrome de dificultad respiratoria aguda en malaria por *P. vivax*. Acta medica colombiana. 1996; 21 (3): 146-150
53. Artavanis-Tsakonas K. and Riley E.M. Innate Immune Response to Malaria: Rapid Induction of IFN- γ from Human NK Cells by Live *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes. The Journal of Immunology, 2002, 169: 2956–2963.
54. Artavanis-Tsakonas K, J E Tongren, and E M Riley. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. Clin Exp Immunol. 2003; 133(2): 145–152.
55. Karunaweera Nadira, Deepani Wanasekara, Vishvanath Chandrasekharan, Kamini Mendis and Richard Carter. *Plasmodium vivax*: paroxysm-associated lipids mediate leukocyte aggregation. Malaria Journal 2007, 6:62
56. Martins Braga Érika, Kézia Katiani Gorza Scopel, Natália Tiemi Komatsu, Mônica da Silva. Polymorphism of the Fc γ receptor IIa and malaria morbidity. Journal of Molecular and Genetic Medicine. 2005; 1(1), 5-10
57. Toyabe S, Kuwano Y, Takeda K, Uchiyama M. Abo T. IgA nephropathy-specific expression of the iGA Fc receptors (CD89) on blood phagocytic cells. Clin. Exp. Immunol. 1997 Nov; 110(2): 226-32
58. Conrad DH. Fc γ RII/CD23: the low affinity receptor of IgE. Annu. Rev. Immunol. 1990; 8: 623

59. Voice JK, Lanchman PJ. Neutrophil Fc gamma and complement receptors involved in binding soluble IgG immune complex and in specific granule release induced by soluble IgG immune complexes. *Eur. J. Immunol.* 1997 Oct;27(10): 2514-23
60. Flesch BK, Maass W, Neppert J. NA1/NA2 antisera inhibit FcgammaRI- but not FcgammaRII- mediated phagocytosis. *Vox Sang.* 1998; 75(3):247-52
61. Indik ZK, Park JG, Hunter S, Schreiber AD. The molecular dissection of Fcγ Receptor mediated phagocytosis. *Blood.* 1995; 86: 4389
62. Ravetch JV. Fc receptors: rubor redux. *Cell.* 1994 Aug; 26:78(4):553-60
63. Moura E, Verheul A Marx J. Evaluation of the role of Fc gamma and complement receptors in the decreased phagocytosis of hereditary haemochromatosis patients. *Scand. J. Immunol.* 1997; 46: 339
64. Greenberg S, Chang P, Silverstein SC. Tyrosine phosphorylation is required for Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J Exp Med.* 1993; 177(2):529-34
65. Vaughn DE, Milburn CM, Penny DM, Martin WL, Jonson JL, Bjorkman PJ. Identification of critical IgG binding epitopes on the neonatal Fc receptor. *J Mol Biol.* 1997; 274 (4): 597-607
66. Muta T, Kurosaki T, Misulovin Z, Sanchez M, Nussenzweig MC, Ravetch JV. A 13 aminoacid motif in the cytoplasmic domain of FcγRIIb modulates B-cell receptor signalling. *Nature.* 1994; 368: 70
67. Takai T, Ono M, Hikida M, Ohmori H, Ravetch JV. Augmented humoral and anaphylactic responses in FcγRII-deficient mice. *Nature.* 1996; 379: 346.

68. Pearse RN, Kawabe T, Bolland S, Guinamard R, Kurosaki T, Ravetch JV. SHIP recruitment attenuates Fc gamma RIIB- induced B cell apoptosis. *Immunity*. 1999; 10: 753
69. Sarmay G, Koncz G, Pecht Y, Gergely J. Cooperation between SHP-2 phosphatidylinositol 3-kinase and phosphoinositide 5-phosphatase in the Fc gamma RIIB mediated B cell regulation. *Immunol. Lett.* 1999; 68: 25
70. Bournazos S, Woof JM, Hart SP, Dransfield I. Functional and clinical consequences of Fc receptor polymorphic and copy number variants. *Clinical and Experimental Immunology*. 2009; 157: 244-254
71. Ravetch J, Bolland S. IgG Fc Receptors. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19:275-290
72. Pan L, Pei P. Signaling transduction by IgG receptors. antigens, the Duffy blood group, and erythrocyte invasion. *Prog. Chin Med J.* 2003; 116:487-94
73. Auger MJ, Ross JA. The biology of the macrophage. In: Lewis CE, McGee JD, editors. *The macrophage*. New York: Oxford University Press. 1992; p. 3-74
74. Pleass RJ, Wood JM. Fc receptors and immunity to parasites. *Trends Parasitol.* 2001 Nov; 17(11):545-51
75. Yoneto T, Waki S, Takai T, et al. A critical role of Fc receptor-mediated antibody dependent phagocytosis in the host resistance to blood-stage *Plasmodium berghei* XAT infection. *J. Immunol.* 2001; 166: 6236-41
76. Qiu WQ, de Bruin D, Brownstein BH, Pearse R, Ravetch JV. Organization of the human and mouse low affinity FcγR genes: duplication and recombination. *Science*. 1990; 248: 732-5.
77. Kimberly RP, Salmon JE, Edberg JC. Receptors for immunoglobulin G. Molecular diversity and implications for disease. *Arthritis Rheum.* 1995; 38:306-14

78. Gómez LM, Anaya JM, Sierra FE, Cadena J, Corbí, Martín J . Analysis of DC-SIGN (CD209) Functional Variants in Patients with Tuberculosis. *Human Immunology*. 2006; 10 (67): 808-811.
79. Warmerdam PA, van de Winkel JG, Vlug A, Westerdaal NA, Capel PJ. A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma receptor II is critical for human IgG2 binding. *J Immunol*. 1998; 147: 1338–1343
80. Bredius RG, Derkx BH, Fijen CA, de Wit TP, de Haas M, Weening RS, van Winkel JG, Out TA. Fcγ receptor IIa (CD32) polymorphism in fulminate meningococcal septic shock in children. *J Infect Dis*. 1994 ; 170: 848–853
81. Salmon JE, Millard S, Schachter LA et al. FcγRIIA alleles are heritable risk factors for lupus nephritis in African Americans. *J Clin Invest*, 1996; 97:1348-1354
82. Sanders LAM, Feldman RG, Voorhorst-Ogink MM et al. Human immunoglobulin G (IgG) FcγRIIA (CD32) polymorphism and IgG2-mediated bacterial phagocytosis by neutrophils. *Infect Immun*, 1995; 63, 73-81
83. Karassa F, Trikalinos TA and Ioannidis JPA. The role of FcγRIIA and IIIA polymorphisms in autoimmune diseases. *Biomed Pharmacol*, 2004; 58, 286-291
84. Rodríguez ME, van der Pol WL, Sanders LAM and van der Winkel JGJ. Crucial role of FcγRIIa (CD32) in assessment of functional anti-*Streptococcus pneumoniae* antibody activity in human sera. *J Infect Dis*. 1999; 179, 423-433
85. Jansen WTM, Breukels MA, Snippe H, Sanders LAM, Verheul AFM and Rijkers GT. Fcγ receptor polymorphism determine the magnitude of in vitro phagocytosis of *Strptococcus pneumoniae* mediated by pneumococcal conjugate sera. *J Infect Dis*, 1999; 180, 888-891

86. Stein MP, Edberg JC, Kimberly RP, Mangan EK, Bharadwaj D, Mold C, Du Clos TW. C-reactive protein binding to Fc gamma RIIa on human monocytes and neutrophils is allelespecific. *J Clin Invest.* 2000; 105: 369–376
87. Platonov AE, Shipulin GA, Vershinina IV, Dankert J, van de Winkel JG, Kuijper EJ. Association of human Fc gamma RIIa (CD32) polymorphism with susceptibility and severity of meningococcal disease *Clin Infect Dis.* 1998; 27: 746–750
88. Yee AM, Phan HM, Zuniga R, Salmon JE, Musher DM. Association between Fc gamma RIIa-R131 allotype and bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis.* 2000; 30: 25–28
89. Pied S, Nussler A, Pontent M, Miltgen F, Matile H, Lambert PH, Mazier D. C-reactive protein protects against pre-erythrocytic stages of malaria. *Infect Immun.* 1989; 57: 278–282.
90. Druilhe P, Sabchareon A, Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Perignon JL. In vivo veritas: lessons from immunoglobulin- transfer experiments in malaria patients. *Ann Trop Med Parasit.* 1997; 91: S37–S53
91. Bouharoun-Tayoun H, Druilhe P. *Plasmodium falciparum* malaria: evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity. *Infect Immun.* 1992; 60: 1473–1481
92. Braga EM, Barros RM, Reis TA, Fontes CJ, Morais CG, Martins MS, Krettli AU. Association of the IgG response to *Plasmodium falciparum* merozoite protein (C-terminal 19 kD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 66: 461–466
93. Taylor RR, Allen SJ, Greenwood BM, Riley EM. IgG3 antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 (MSP2): increasing prevalence with age and association with clinical immunity to malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 58: 406–413

94. Oeuvray C, Theisen M, Rogier C, Trape JF, Jepsen S, Druilhe P. Cytophilic immunoglobulin responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal Infect Immun. 2000; 68: 2617–2620
95. Aucan C, Traore Y, Tall F, Nacro B, Traore-Leroux T, Fumoux F, Rihet P. High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to *Plasmodium falciparum* malaria. Infect Immun. 2000; 68: 1252–1258
96. Cooke GS, Aucan C, Walley AJ, Segal S, Greenwood BM, Kwiatkowski DP, Hill AVS. Association of Fc γ receptor IIa (CD32) polymorphism with severe malaria in west África. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2003; 69 (6): 565-568.
97. Hernández MA, Mora N, Rosales C. Transducción de señales del receptor Fc γ RIIIb. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. 2007
98. Omi K, Jun Ohashia, Jintana Patarapotikulb, Hathairad Hananantachaib, Izumi Nakaa, Sornchai Looareesuwanb, Katsushi Tokunagaa. Fc γ receptor IIA and IIIB polymorphisms are associated with susceptibility to cerebral malaria. Parasitology International. 2002; 51; 361–366
99. Kuwano ST, Bordin JA, Chiba AK, Mello AB, Figueredo MS, Vieira-Filho JPB, Fabron A and Kerbaui J. Allelic polymorphisms of human Fc γ receptor IIa and Fc γ receptor IIIb among distinct groups in Brazil Transfusion. 2000; 40: 1388-1392
100. Allison AC. Genetic control of resistance to human malaria. Curr Opin. Immunology. 2009 Oct; 21(5): 499-505. Epub 2009 May 11.
101. Ramírez-Cheyne J, Zarate I. Deficiencia de glucose-6-fosfato deshidrogenasa: situación actual, su relación con malaria y estrategias para calcular su prevalencia. Univ. Med. Bogotá (Colombia), 2009; 50(1):58-76.

102. Mehta A, Mason PJ, Vulliamy TJ. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Bailliere's Clinical Haematology 2000; 13: 21-38.
103. Frank JE. Diagnosis and management of G6PD deficiency. Am Fa Physn. 2005; 72: 1277-82
104. Chen EY, Cheng A, Lee A, Kuang W-J, Hillier L, Green P, et al. Sequence of human glucose-6-phosphate dehydrogenase cloned in plasmids and a yeast artificial chromosome. Genomics. 1991; 10:792-800
105. Ruwende C, Hill A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria. J Mol Med. 1998; 76:581-8
106. Persico MG, Viglietto G, Martino G, Toniolo D, Paonessa G, Moscatelli C, et al. Isolation of human cDNA clones: primary structure of protein and unusual 5' non-coding region. Nucleic Acids Res. 1986; 14: 2511
107. Fonseca D, Mateus H, Silva C, Contreras N, Restrepo C. Deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. Aspectos generales de la eritroenzimopatía más frecuente en el mundo. Acta Med Colomb 2005; 30:59-64
108. Lica L. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. (Sitio en Internet) Caremark. Disponible en <http://healthresources.caremark.com/topic/printview>. (12 octubre 2006)
109. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Genética en medicina. 5ª edición. Barcelona, Masson, S.A. 2005
110. Luzzatto L, Battistuzzi G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Adv Med Genet. 1985; 14:217-329
111. Fortin A, Stevenson M M, Gros P. Susceptibility to malaria as a complex trait: big pressure from a tiny creature. Human Molecular Genetics, 2002 Oct 1; 11(20):2469-78

112. Olsson ML, Hansson C, Avent ND, Akesson IE, Green CA, Daniels GL. A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (FY) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. *Transfusion*. 1998; 38:168-173
113. Donahue RP, Bias WB, Renwick JH, McKusick VA: Probable assignment of the Duffy blood group locus to chromosome 1 in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968, 61:949-955
114. Collins A, Keats BJ, Dracopoli N, Shields DC, Morton NE: Integration of gene maps: chromosome 1. *Proc Natl Acad Science USA* 1992, 89:4598-602.
115. Cavasini CE, de Mattos LC, Couto AA, Couto VS, Gollino Y, Moretti LJ, Bonini-Domingos CR, Rossit AR, Castilho L, Machado RL. Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. *Malaria Journal*. 2007 Dec 19; 6:167
116. Pogo AO, Chaudhuri A: The Duffy protein: A malarial and chemokine receptor. *Semin Hemat* 2000; 37:122-129.
117. Cavasini CE, Pereira FJT, Ribeiro WL, Wunderlich G, Ferreira MU: Duffy blood group genotypes among malaria patients in Rondônia, Western Brazilian Amazon. *Rev. Soc Bra Med Trop* 2001, 34(6):591-595.
118. Shi YP, Nahlen BL, Kariuki S, Urdahl KB, McElroy PD, Roberts JM, Lal AA. Fcγ receptor IIa (CD32) polymorphism is associated with protection of infants against high-density *Plasmodium falciparum* infection. VII. Asembo Bay Cohort Project. *J Infect Dis*. 2001; 184(1):107-11
119. Ouma C, Keller CC, Opondo DA, Were T, Otieno RO, Otieno MF, Orago AS, Ong'Echa JM, Vulule JM, Ferrell RE, Perkins DJ. Association of Fc γ receptor IIa (CD32) polymorphism with malarial anemia and high-density parasitemia in infants and young children. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 2006; Apr;74(4): 573–7

120. Schuldt K, Esser C, Evans J, May J, Timmann C, Ehmen C, Loag W, Ansong D, Ziegler A, Agbenyega T, Meyer CG, Horstmann RD. FCGR2A functional genetic variant associated with susceptibility to severe malarial anaemia in Ghanaian children. *J Med Genet*. 2010 Jul; 47(7):471-5. Epub 2009 Dec 3.
121. Willcocks LC, Carr EJ, Niederer HA, Rayner TF, Williams TN, Yang W, Scott JA, Urban BC, Peshu N, Vyse TJ, Lau YL, Lyons PA, Smith KG A defunctioning polymorphism in FCGR2B is associated with protection against malaria but susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107(17):7881-5.
122. OMS. Malaria Diagnosis: Memorandum from a WHO Meeting. *Bull. Wld Helth Org*. 1988; 66 (5). 575-594
123. Ferreira W and Avila S. L. M. Diagnostico Laboratorial das principais doencas infecciosa e auto-inmunes. 2da Edicion. Editorial guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2001.
124. Bracho Carmen and Pérez Hilda. An immunocytochemical test for the diagnosis of antibodies to *Plasmodium vivax*. *Parasite Immunology*. 1992; 14:48 1-487
125. Pérez Hilda, Wide Albina, Bracho Carmen, De La Rosa Mercedes. *Plasmodium vivax*: detection of blood parasites using fluorochrome labelled monoclonal antibodies. *Parasite Immunology*, 1995: 17: 305-312
126. Cunha MG, Medina TS, Oliveira SG, Marinho AN, Póvoa MM, Ribeiro-dos-Santos AK. Development of a Polymerase Chain Reaction (PCR) method based on amplification of mitochondrial DNA to detect *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Acta Trop*. 2009 Jul;111(1):35-8. Epub 2009 Feb 26.

127. Betschart B, Steiger S. Quantitative determination of chloroquine and desethylchloroquine in biological fluids by high performance thin layer chromatography. *Acta Trop.* 1986; 43(2):125-30.
128. WHO. World Malaria Report. RBM/ WHO/UNICEF. Geneva. 1989
129. Bunce M. In *Histocompatibility testing*. Ed: Lidwell and Navarrette C. Imperial College Press, London, 2000; 167-176
130. Maniatis T, Sambrook J, Fritsch E. *Molecular Cloning: Laboratory Manual*. 1982
131. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press. 1989.
132. Hessner MJ, Curtis BR, Endean DJ, Aster RH. Determination of neutrophil antigen gene frequencies in five ethnic groups by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Transfusion.* 1996; 36: 895-899.
133. Bonferroni, CE. *Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità*. Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze. 1936; 8:3-62
134. Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet* 1955; 19: 251-53.
135. Haldane JBS. The estimation and significance of the logarithm of a ratio of frequencies. *Ann Hum Genet.* 1955; 20: 309-11.
136. Tiago S Medina et al. Increased interleukin-10 and interferon-gamma levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. *Malaria Journal* 2011, 10:264.
137. Hänscheid T, Grobusch MP. How useful is PCR in the diagnosis of malaria? *Trends Parasitol.* 2002; 18, 395-398.

138. Guerin PJ, Olliaro P, Nosten, F, Druilhe P, Laxminarayan R., Binka F, Kilama WL, Ford N, White NJ. Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. *Lancet Infect Dis.*2002 Sep;2 (9):564-73.
139. Bogenhagen D, Clayton D. The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 1974; 249, 7991–7995.
140. Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace CD. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*1980; 77, 6715–6719.
141. Preiser PR, Wilson RJ, Moore PW, McCready S, Hajibagheri MA, Blight KJ, Strath M, Williamson DH. Recombination associated with replication of malarial mitochondrial DNA. *EMBO J.* 1996 Feb 1;15(3): 684-93.
142. Leslie T, Briceño M, Mayan I, Mohammed N, Klinkenberg E, Sibley CH, Whitty CJ, Rowland M. The impact of phenotypic and genotypic G6PD deficiency on risk of *Plasmodium vivax* infection: a case-control study amongst Afghan refugees in Pakistan. *PLoS Med.* 2010 May 25;7(5):e1000283.
143. Carvalho TL, Ribolla PEM, Curi RA, Mota LS. Characterization and transcriptional analysis of the promoter region of the Duffy blood group, chemokine receptor (DARC) gene in cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009; 15; 132(2-4):153-9.
144. Beattie KM. The Duffy blood group system: distribution, serology and genetics. In: Pierce SR, MacPherson C. (Eds.), *Blood Group Systems: Duffy, Kidd and Lutheran*. American of Blood Banks, Arlington, 1988; pp. 1–25.
145. Arends T, Salazar R, Anchustegui M, Garlin G. Hemoglobin variant in the northeastern region of Venezuela. *Interciencia* 1990; 15: 36-41
146. Morgan AW, Robinson JI, Barrett JH, Martin J, Walker A, Babbage SJ, Ollier WE, Gonzalez-Gay MA, Isaacs JD. Association of FCGR2A and FCGR2A-FCGR3A

- haplotypes with susceptibility to giant cell arteritis. *Arthritis Res Ther*. 2006; 8(4): R109.
147. Brouwer KC, Lal AA, Mirel LB et al. Polymorphism of Fc receptor IIa for immunoglobulin G is associated with placental malaria in HIV-1-positive women in Western Kenya. *J Infect Dis*. 2004; 190, 1192-1198.
148. Nasr A, Iriemenam NC, Troye-Blomberg M, Giha HA, Balogun HA, Osman OF, Montgomery SM, ElGhazali G, Berzins K: Fc gamma receptor IIa (CD32) polymorphism and antibody responses to asexual blood-stage antigens of *Plasmodium falciparum* malaria in Sudanese patients. *Scand J Immunol* 2007; 66:87-96.
149. Sinha S, Mishra SK, Sharma S, Patibandla PK, Mallick PK, Sharma SK, Mohanty S, Pati SS, Mishra SK, Ramteke BK, Bhatt R, Joshi H, Dash AP, Ahuja RC, Awasthi S, Indian Genome Variation Consortium, Venkatesh V, Habib S. Polymorphisms of TNF-enhancer and gene for FcgammaRIIa correlate with the severity of falciparum malaria in the ethnically diverse Indian population. *Malar J*. 2008 Jan 14; 7:13
150. Ntoumi F, Flori L, Mayengue PI, Matondo Maya DW, Issifou S, Deloron P, Lell B, Kremsner PG, Rihet P: Influence of carriage of hemoglobin AS and the Fc gamma receptor IIa-R131 allele on levels of immunoglobulin G2 antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens in Gabonese children. *J Infect Dis*. 2005; 192:1975-1980.
151. Ouma C, Keller CC, Opondo DA, Were T, Otieno RO, Otieno MF, Orago AS, Ong'Echa JM, Vulule JM, Ferrell RE, Perkins DJ. Association of FC gamma receptor IIA (CD32) polymorphism with malarial anemia and high-density parasitemia in infants and young children. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 Apr; 74(4):573-7.
152. Nasr A, Iriemenam NC, Giha HA, Balogun HA, Anders RF, Troye-Blomberg M, ElGhazali G, Berzins K. FcgammaRIIa (CD32) polymorphism and anti-malarial IgG subclass pattern among Fulani and sympatric ethnic groups living in eastern Sudan. *Malaria J*. 2009 Mar 13;8:43

153. Guadarrama Ángela. Influencia de la variabilidad de los genes FCGR Y DC-SIGN en la infección por virus dengue. Trabajo no publicado, IVIC. Altos de pipe. 2010
154. Simmons A, Rodriguez-Arroyo G, Rodriguez-Larralde A. Admixture estimates based on ABO, Rh and nine STRs in two Venezuelan regions. *Annals of Human Biology*. 2007 Jan 34;(1): 56–67
155. Vívenes de Lugo M, Rodríguez-Larralde A, Castro De Guerra D. Estimación de mezcla en base a grupos sanguíneos (ABO, Rh) y 3 marcadores tipo STR en la región oriental de Venezuela. International Conference held at the VIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Antropología Biológica, 2004, Caracas, Venezuela
156. Vívenes de Lugo M, Rodríguez-Larralde A, Castro De Guerra D. Beta-globin gene cluster haplotypes as evidence of African gene flow to the northeastern coast of Venezuela. *Am J Hum Biol*. 2003;15(1):29-37
157. Lehrnbecher T, Foster CB, Zhu S, Leitman SF, Goldin LR, Huppi K, Chanock SJ. Variant genotypes of the low-affinity Fcγgamma receptors in two control populations and a review of low-affinity Fcγgamma receptor polymorphisms in control and disease populations. *Blood*. 1999; 94(12):4220-32.
158. Osborne J, Chacko G, Brandt J, Anderson C. Ethnic variation in frequency of an allelic polymorphism of human FcγRIIa determined with allele specific oligonucleotide probes. *J Immunol Methods*. 1994; 173:207-217.
159. Van Schie RC, Wilson ME. Evaluation of human FcγgammaRIIA (CD32) and FcγgammaRIIIB (CD16) polymorphisms in Caucasians and African-Americans using salivary DNA. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000; 7(4):676-81
160. Moritz E, Norcia AM, Cardone JD, Kuwano ST, Chiba AK, Yamamoto M, Bordin JO. Human neutrophil alloantigens systems. *An Acad Bras Cienc*. 2009 Sep; 81(3):559-69.

ANEXOS

Nº Historia Clínica _____ Fecha de Consulta: _____

Nombre y Apellido: _____

C.I.: _____ Edad: _____ Sexo: M ____ F ____

Soltero ☐ Casado ☐ Con pareja Viudo ☐ Divorciado ☐ Ocupación: _____

Lugar de Nacimiento. _____

Sector: _____ Municipio _____ Parroquia _____

Años en el Sector: _____ Lugar de donde procede: _____

Teléfono CANTV _____ Celular: _____

Dirección (punto de referencia):

Motivo de Consulta:	SI	NO	Antecedentes personales	SI	NO
			Embarazo		
Hepatomegalia.			Cefalea		
Esplenomegalia.			Convulsión		
Anemia por malaria (MA)			Anemia		
			Hemoglobinopatías		
			Desmayos		
			Fiebre/escalofríos		
			Hipertensión Arterial		
Enfermedad Actual			Diabetes		

			Obesidad		
<u>Infección por <i>P.vivax</i></u>			Inmunosupresión		
			Tumores		
			HIV		
			Alcoholismo		
			Fumador		
			Transplantados		
			Tto. Inmunosupresor		
			Tto anticoagulante		
			Tto con esteroides		
Datos Epidemiológicos			Enfermedades Familiares	SI	NO
Usa antimaláricos					
Usa repelentes			Hipertensión Arterial		
Usa mosquiteros para dormir			Diabetes		
Tiene picadas de mosquitos			Obesidad		
¿Se expone sin protección? (Sin mangas largas, sin repelentes, horas vespertinas)			Cáncer		
Ventanas con malla metálica			Psiquiátricos		
Algún vecino a tenido malaria			Otros:		

Examen Físico Fecha: _____

TA: _____ Peso: _____ Talla: _____ IMC (peso/talla²): _____

	SI	NO
Escalofríos		
Sudoración Profusa		
Debilidad		
Dolor abdominal a la palpación superficial		
Dolor abdominal a la palpación profunda		
Hepatomegalía		
Esplenomegalia		
Ubicación del dolor:		
Hepatometría		
Línea Paraesternal Izquierda		
Línea medioclavicular		
Línea axilar anterior		
Esplenomegalia (Índice de BOYD)		
0=Bazo normal o no palpable (Bazo negativo)		
1= Bazos palpables solo cuando el sujeto inspira profundamente		
2= Bazos palpables sin la ayuda del sujeto, que no pasan en punto medio entre el reborde costal y una línea horizontal a través del ombligo.		
3=Bazos que se proyectan mas allá del punto medio anterior, hasta el nivel del ombligo, pero no mas allá de él.		
4= Bazos por debajo del nivel umbilical, pero que no sobrepasan el punto medio de su distancia a la línea de la sínfisis del pubis.		
5=Bazos mas grande que los anteriores		

Exámenes de laboratorio

Fecha: _____

Gota gruesa y carga parasitaria:

Extendido y tamaño de los glóbulos rojos

Glicemia en ayunas/ o post-pandrial

Hematocrito

Diagnóstico Parasitológico Final

	SI	NO	Fecha
Malaria por <i>P. vivax</i>			
Mixta			
Sin Malaria			

-----Modelo de reporte de resultados-----



Instituto de Medicina Tropical
Facultad de Medicina
Universidad Central de Venezuela
Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas
Telfs: 0212-504-11-63

Fecha: _____

Nombres y Apellidos: _____

C.I.: _____ Edad: _____ Sexo: _____

Dirección: _____

Gota gruesa y Extendido: _____

Glicemia: _____

Hematocrito: _____

Diagnóstico: _____

Observaciones: _____

Firma y Sello

**INFORMACIÓN PARA LOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO GRUPO
CONTROL**

La Sección Inmunogenética del Laboratorio de Fisiopatología, del Centro de Medicina Experimental, del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) va a llevar a

cabo el proyecto de investigación titulado “Influencia de la variabilidad genética de los receptores de inmunoglobulina G en la infección por *Plasmodium vivax*. ”

Para realizar la investigación señalada, se contará con dos grupos de participantes: uno no infectado por el parásito *P. vivax* (grupo control) y otro grupo que presenta la infección por el parásito *P. vivax* (pacientes).

Su participación en el proyecto, como individuo sano, consiste en donar una muestra de sangre de 10 mL. Esta muestra se le extraerá de la vena de la región anterior del antebrazo, previa desinfección del área de la piel, por una persona capacitada en este procedimiento. Para la prueba parasitológica gota gruesa y el extendido, glicemia y hematocrito, se tomará una muestra de sangre del lóbulo de la oreja o de la yema de los dedos. Se realizará examen físico para evaluar alteraciones en hígado y bazo, el resultado se registrará en la historia clínica correspondiente. En caso de presentarse algún problema o tener cualquier pregunta que tenga en relación con este estudio, le será respondida oportunamente por la médica Rosa N. García L., investigadora participante en el estudio, con quien se puede comunicar por el teléfono: 0412-7096887.

La dirección de epidemiología del Ministerio del Poder Popular para la Salud, proporcionará los medicamentos anti-maláricos a los Hospitales y a los ambulatorios, o a cualquier individuo que sea diagnosticado durante esta investigación. Los médicos internistas y epidemiólogos de las instituciones de salud en las cuales trabajaremos se hacen responsables y garantizan que el tratamiento de los pacientes positivos para *Plasmodium* sea cumplido.

La muestra sanguínea a donar así como la información que suministre al equipo de investigadores será utilizada para determinar: si existen factores de riesgos para contraer la infección por parásitos de malaria. (*P. vivax*) Las muestras serán almacenadas y custodiadas por la Dra. Mercedes Fernández-Mestre en el Laboratorio de Fisiopatología del IVIC, para ser utilizadas en futuras investigaciones, que permitan conocer más acerca de enfermedades infecciosas, tales como la Malaria, bajo previa aprobación de la Comisión de Bioética.

Ni los estudios realizados en las muestras de sangre por Usted donadas, ni las evaluaciones clínicas realizadas tendrán ningún costo económico.

Su participación en dicho estudio no implica riesgo ni inconveniente alguno adicional para su salud. Usted puede retirarse del proyecto en cualquier momento, sin que ello conlleve algún tipo de consecuencia negativa.

Los resultados obtenidos en el presente estudio solamente serán usados con fines académicos y se le informarán oportunamente. El equipo de investigadores le garantiza confidencialidad relacionada tanto con su identidad como la de cualquier información relativa a su persona a la que tengan acceso por concepto de su participación en el proyecto antes mencionado.

CONSENTIMIENTO VALIDO PARA EL GRUPO CONTROL

Yo, _____ C.I.: _____
nacionalidad _____ estado civil _____ domiciliado en: _____
_____, siendo mayor de 18 años en uso pleno
de mis facultades mentales y sin coacción ni violencia alguna, en completo conocimiento
de la naturaleza, forma, duración, propósito, inconvenientes y riesgos relacionados con el
estudio que se realizará, declaro mediante la presente:

1.-Haber sido informado de manera objetiva, clara y sencilla, por parte de la Dra. Rosa García, los aspectos relacionados con el proyecto de investigación titulado: “Influencia de la variabilidad genética de los receptores de inmunoglobulina G en la infección por *Plasmodium vivax*.”, coordinado por la Dra. Mercedes Fernández-Mestre del Laboratorio de Fisiopatología del Centro de Medicina Experimental del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

2.-Tener conocimiento claro que el objetivo fundamental del trabajo es evaluar el polimorfismo de los genes del receptor de inmunoglobulinas y determinar indicadores de laboratorio que permitan predecir el desarrollo de la enfermedad.

3.-Haber sido informado que para participar en el proyecto, es necesario realizarme varias prueba diagnósticas. Para lo cual autorizo al personal calificado a que realice la prueba parasitológica gota gruesa y el extendido, glicemia y hematocrito, el examen físico por la médica Rosa García. Adicionalmente, autorizo para que me realicen una entrevista cuya información permanecerá en estricta confidencialidad.

4.- En colaboración con los médicos internistas y epidemiólogos de las instituciones de salud, se garantiza el tratamiento antimalárico de los individuos positivos para *Plasmodium*

5.- Mi participación en el proyecto consistirá en la donación de 10 mL de sangre, la cual se tomará de una vena del antebrazo por personal especializado.

6.- El sobrante y parte de las células de la muestra donada, serán guardadas en el Laboratorio de Fisiopatología del Centro de Medicina Experimental del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y utilizado en futuros estudios, previa aprobación del Comité de Bioética y solamente con fines académicos y no comerciales.

7.- Que se garantiza total confidencialidad relacionada tanto con mi identidad como de cualquier información relativa a mi persona.

8.-Que los resultados obtenidos en este estudio serán utilizados para fines académicos y que las evaluaciones clínicas realizadas no tendrán ningún costo económico.

9.-Que cualquier pregunta que yo tenga en relación a este estudio, me será respondida oportunamente por parte del equipo de investigadores del proyecto y/o médicos: Dra. Mercedes Fernández y la médica Rosa García, con quienes me puedo comunicar a través de los teléfonos: 0212-5041163 y 0412-7096887, respectivamente.

10.-Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido, ni pretendo recibir, algún beneficio de tipo económico producto de los hallazgos originados en este proyecto.

DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO:

Luego de haber leído, comprendido y recibido las respuestas a mis preguntas con respecto a este formato de consentimiento y por cuanto mi participación en este estudio es totalmente voluntaria acuerdo:

A.- Aceptar las condiciones estipuladas en el mismo y a la vez autorizar al equipo de investigadores realizar el referido estudio en las muestras de sangre que acepto donar a los fines indicados anteriormente.

B.- Reservarme el derecho de revocar esta autorización así como mi participación en el proyecto, en cualquier momento, sin que ello conlleve algún tipo de consecuencia negativa para mi persona.

Firma del Voluntario_____

Firma del Médico tratante_____

Nombres_____

Nombres_____

C.I._____

C.I._____

Firma Testigo:_____

Firma Testigo:_____

Nombres_____

Nombres_____

C.I._____

C.I._____

DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR:

Luego de haber explicado detalladamente al voluntario la naturaleza del protocolo mencionado. Certifico mediante la presente que, a mi leal saber, el sujeto que firma este formulario de consentimiento comprende la naturaleza, requerimientos, riesgos y beneficios de la participación en este estudio. Ningún problema de índole médica, de idioma o de instrucción ha impedido al sujeto tener una clara comprensión de su compromiso con este estudio.

Nombre y Apellido del Investigador

Firma

Lugar y Fecha

INFORMACIÓN PARA LOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO PACIENTES CON MALARIA.

La Sección Inmunogenética del Laboratorio de Fisiopatología, del Centro de Medicina Experimental, del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) va a llevar a cabo el proyecto de investigación titulado “Influencia de la variabilidad genética de los receptores de inmunoglobulina G en la infección por *Plasmodium vivax*. ”

Para realizar la investigación señalada, se contará con dos grupos de participantes: uno no infectado por el parásito *P. vivax* (grupo control) y otro grupo que presenta la infección por el parásito *P. vivax* (pacientes).

Su participación en el proyecto consiste en donar una muestra de sangre de 10 mL, esta muestra se le extraerá de la vena de la región anterior del antebrazo, previa desinfección del área de la piel, por una persona capacitada en este procedimiento. Para la prueba parasitológica: gota gruesa y el extendido, glicemia y hematocrito, se tomará una muestra de sangre del lóbulo de la oreja o de la yema de los dedos. Se realizará examen físico para evaluar alteraciones en hígado y bazo, el resultado se registrará en la historia clínica correspondiente. En caso de presentarse algún problema o tener cualquier pregunta que tenga en relación con este estudio, le será respondida oportunamente por la médica Rosa N. García L., investigadora participante en el estudio, con quien se puede comunicar por el teléfono: 0412-7096887.

La dirección de epidemiología del Ministerio del Poder Popular para la Salud, proporcionará los medicamentos anti-maláricos a los Hospitales y a los ambulatorios, o a cualquier individuo que sea diagnosticado durante esta investigación. Los médicos internistas y epidemiólogos de las instituciones de salud en las cuales trabajaremos se hacen responsables y garantizan que el tratamiento de los pacientes positivos para *Plasmodium* sea cumplido.

La muestra sanguínea a donar así como la información que suministre al equipo de investigadores será utilizada para determinar: si existen factores de riesgos para contraer la infección por parásitos de malaria. (*P. vivax*). Las muestras serán almacenadas y custodiadas por la Dra. Mercedes Fernández-Mestre en el Laboratorio de Fisiopatología

del IVIC, para ser utilizadas en futuras investigaciones, que permitan conocer más acerca de enfermedades infecciosas, tales como la Malaria, bajo previa aprobación de la Comisión de Bioética del IVIC.

Ni los estudios realizados en las muestras de sangre por Usted donadas, ni las evaluaciones clínicas realizadas tendrán ningún costo económico.

Su participación en dicho estudio no implica riesgo ni inconveniente alguno adicional para su salud. Usted puede retirarse del proyecto en cualquier momento, sin que ello conlleve algún tipo de consecuencia negativa.

Los resultados obtenidos en el presente estudio solamente serán usados con fines académicos y se le informarán oportunamente. El equipo de investigadores le garantiza confidencialidad relacionada tanto con su identidad como la de cualquier información relativa a su persona a la que tengan acceso por concepto de su participación en el proyecto antes mencionado.

CONSENTIMIENTO VALIDO DE LOS PACIENTES CON MALARIA

Yo, _____ C.I.: _____
nacionalidad _____ estado civil _____ domiciliado en: _____
_____, siendo mayor de 18 años en uso pleno
de mis facultades mentales y sin coacción ni violencia alguna, en completo conocimiento
de la naturaleza, forma, duración, propósito, inconvenientes y riesgos relacionados con el
estudio que se realizará, declaro mediante la presente:

1.-Haber sido informado de manera objetiva, clara y sencilla, por parte de la Dra. Rosa García, los aspectos relacionados con el proyecto de investigación titulado: “Influencia de la variabilidad genética de los receptores de inmunoglobulina G en la infección por *Plasmodium vivax*.”, coordinado por la Dra. Mercedes Fernández-Mestre del Laboratorio de Fisiopatología del Centro de Medicina Experimental del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

2.- Tener conocimiento claro que el objetivo fundamental del trabajo es evaluar el polimorfismo de los genes de inmunoglobulinas y determinar indicadores de laboratorio que permitan predecir la evolución clínica de la enfermedad.

3.-Haber sido informado que para participar en el proyecto, es necesario realizarme varias prueba diagnósticas. Para lo cual autorizo al personal calificado a que realice la prueba parasitológica gota gruesa y el extendido, glicemia y hematocrito, el examen físico por la médica Rosa García. Adicionalmente, autorizo para que me realicen una entrevista cuya información permanecerá en estricta confidencialidad.

4.- En colaboración con los médicos internistas y epidemiólogos de las instituciones de salud, se garantiza el tratamiento antimalárico de los individuos positivos para *Plasmodium*

5.- Mi participación en el proyecto consistirá en la donación de 10 mL de sangre, la cual se tomará de una vena del antebrazo por personal especializado.

6.- El sobrante y parte de las células de la muestra donada, será guardado en el Laboratorio de Fisiopatología del Centro de Medicina Experimental del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y utilizado en futuros estudios, previa aprobación del Comité de Bioética y solamente con fines académicos y no comerciales.

7.- Que se garantiza total confidencialidad relacionada tanto con mi identidad como de cualquier información relativa a mi persona.

8.- Que los resultados obtenidos en este estudio serán utilizados para fines académicos y que las evaluaciones clínicas realizadas no tendrán ningún costo económico.

9.-Que cualquier pregunta que yo tenga en relación a este estudio, me será respondida oportunamente por parte del equipo de investigadores del proyecto y/o médicos: Dra. Mercedes Fernández y la médica Rosa García, con quienes me puedo comunicar a través de los teléfonos: 0212-504.11.63 y 0412-7096887, respectivamente.

10.-Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido, ni pretendo recibir, algún beneficio de tipo económico producto de los hallazgos originados en este proyecto.

DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO:

Luego de haber leído, comprendido y recibido las respuestas a mis preguntas con respecto a este formato de consentimiento y por cuanto mi participación en este estudio es totalmente voluntaria acuerdo:

A.- Aceptar las condiciones estipuladas en el mismo y a la vez autorizar al equipo de investigadores a realizar el referido estudio en las muestras de sangre que acepto donar a los fines indicados anteriormente.

B.- Reservarme el derecho de revocar esta autorización así como mi participación en el proyecto, en cualquier momento, sin que ello conlleve algún tipo de consecuencia negativa para mi persona.

Firma del Voluntario_____

Firma del Médico tratante_____

Nombres_____

Nombres_____

C.I. _____

C.I. _____

Firma Testigo: _____

Firma Testigo: _____

Nombres _____

Nombres _____

C.I. _____

C.I. _____

DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR:

Luego de haber explicado detalladamente al voluntario la naturaleza del protocolo mencionado. Certifico mediante la presente que, a mi leal saber, el sujeto que firma este formulario de consentimiento comprende la naturaleza, requerimientos, riesgos y beneficios de la participación en este estudio. Ningún problema de índole médica, de idioma o de instrucción ha impedido al sujeto tener una clara comprensión de su compromiso con este estudio.

Nombre y Apellido del Investigador

Firma

Lugar y Fecha

Municipios Bermúdez, Benítez y Arismendi

Municipio Bermúdez (Parroquia Bolívar)		Municipio Benítez (El Pilar)		Municipio Arismendi.	
Hospital	Ambulatorios	Hospital	Ambulatorios	Hospital	Ambulatorios
Hospital de Carúpano	Centro Diagnóstico de malaria Playa Grande	Hospital Dr. Alberto Mussa Yibiri - CDI	Guariquen	Hospital Río Caribe	Santa Isabel
	Guiria de la Playa		Carituco		Chaguarama de Roero
	Playa Grande Adentro		Mucuro		Chaguaracal
	Copacabana		Caño de Ajíes		Río Santiago
	Guaca				Puy-Puy
					San Juan de la Galdonas

Municipios Cajigal y Ribero

Municipio Cajigal		Municipio Ribero				
Hospital	Ambulatorios	Hospital	Ambulatorios	Medicatura	Ambulatorios	Puestos Asistenciales
Hospital de Yaguaraparo	Choro-Choro	Hospital Diego Carbonell	La Esmeralda	Catuaro	La Esmeralda	Las Vegas
	Quebrada de la niña.		Pantoño		Muelle de Cariaco	Amanita
	Cachipal		Juan Antonio		Santa María	Santa Ana
	Río Seco		Chamariapa		Santa Rosa	Chiguana
					Campearito	Guacarapo
					San Bonifacio	Aguas Calientes
					La Soledad Segunda calle	Centro Poblado
						Malvascual
						Cerezal
						Las Manoas
						Campoma
						Saucedo

